

**Quantification des ecdystéroïdes et acides rétinoïques chez la
puce d'eau (*D.magna*) par chromatographie liquide couplée à
la spectrométrie de masse en tandem**

par

Philippe Venne

Mémoire présenté au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
FACULTÉ DES SCIENCES, UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Décembre 2015

Le 16 décembre 2015

*le jury a accepté la thèse de monsieur Philippe Venne
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Pedro A Segura
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeure Viviane Yargeau
Codirectrice de recherche
McGill University

Professeur Olivier Bolduc
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Président-rapporteur
Département de chimie

*The 'four Ss' of good trace analyses—sensitivity, selectivity, speed, and \$.
-Fred W. McLafferty-*

SOMMAIRE

L'introduction de composé d'origine anthropogénique (produits pharmaceutiques, et de soin personnel, retardateur de flammes, plastifiants, etc.) par les stations de traitement des eaux usées municipales ainsi que le devenir de ses composés dans l'environnement est une problématique d'intérêt mondial. L'élimination de ses contaminants d'intérêt émergent des eaux usées s'effectue au niveau des stations de traitement des eaux usées qui, pour la plupart, ne sont pas conçues pour réaliser cette tâche. En effet, celles-ci présentent des niveaux très variables d'efficacité de dégradation/transformation de la plupart des contaminants émergents ce qui laisse dans l'effluent de ces stations des concentrations habituellement inférieures à quelques microgrammes par litres d'au moins plusieurs centaines de contaminants. Quelques études ont démontrés que l'exposition chronique à ces concentrations environnementales de différents CIE donne lieu à des effets toxiques chez le méné à tête de boule (effondrement de la population) et le gammare (diminution de l'activité). Cependant, les méthodes classiques utilisées pour l'évaluation de la toxicité ne sont pas suffisamment sensibles pour déceler des effets sublétaux aux concentrations environnementales observées dans les milieux recevant ces rejets de station d'épuration. Bien entendu, il est impossible de concevoir un procédé unique capable d'éliminer la totalité des contaminants d'intérêt émergent (présents ou futurs) des eaux usées. Il est donc nécessaire de créer des approches capables de prioriser et de cibler les composés qui doivent être éliminés. Ce projet de recherche met de l'avant l'hypothèse qu'une étude métabolomique ciblé serait capable de répondre à cette problématique. L'approche utilisée vise à ajouter un ou plusieurs points de terminaison (fluctuation des métabolites) au test de toxicité aiguë des effluents déjà effectué sur la puce d'eau (*Daphnia magna*) en quantifiant des molécules essentielles à la survie de cette espèce (ecdystéroïdes et acides rétinoïques). Les daphnies sont des modèles idéaux pour ce type d'étude puisqu'il s'agit d'organismes essentiels du zooplancton dans le monde entier. L'espèce *D. magna* est retrouvée dans l'hémisphère nord dans les lacs, rivières et étangs temporaires, elle se reproduit rapidement, est facile à cultiver et se reproduit par parthénogénèse.

La quantification des ecdystéroïdes et acides rétinoïques aux concentrations observées chez la puce d'eau (picogramme par individu) est typiquement atteinte par dosage radio-immunologique (*radioimmunoassay*). Cependant, ce type de méthode ne permet pas d'identifier spécifiquement l'analyte ciblé, mais plutôt la somme de toutes molécules produisant une réaction immunologique similaire à celui-ci appelée "équivalent immunologique" et les résultats obtenus dépendent de l'anticorps, de la préparation effectuée et du lot de l'anticorps utilisé. Ce manque de sélectivité et variabilité des données obtenues pose problème pour la comparaison inter-laboratoires de résultats et a donc forcé le développement d'une nouvelle méthode analytique.

Le présent document décrit le développement et la validation d'une méthode de quantification par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse permettant d'atteindre des limites de quantification allant de 210 à 380 pg mL⁻¹ pour trois ecdystéroïdes (20-hydroxyecdysone, ecdysone et ponasterone A) et de 5 ng mL⁻¹ pour la somme des isomères de l'acide rétinoïque.

La quantification de ces analytes aux faibles concentrations observées chez la puce d'eau a nécessité l'optimisation des paramètres instrumentaux, de la préparation d'échantillon et l'optimisation des conditions chromatographiques. Au final, la 20-hydroxyecdysone a pu être quantifiée à 19 ± 8 pg ind⁻¹ pour les adultes (475 ± 200 pg mL⁻¹, n=3) et à 3.6 ± 1.0 pg ind⁻¹ pour les juvéniles (360 ± 10 pg mL⁻¹, n=3), mais seulement détectée chez les néonates à ≈ 0.19 pg ind⁻¹ (≈ 19 pg mL⁻¹, n=3). L'ecdysone a également pu être détectée à ≈ 1.8 pg ind⁻¹ chez les spécimens de taille adulte (≈ 180 pg mL⁻¹, n=3).

Le projet suivant vise à augmenter les connaissances sur l'effet de contaminants d'intérêt émergents sur l'environnement et sur le métabolisme de la puce d'eau *D.magna* ainsi que fournir une méthode potentiellement capable d'évaluer le risque d'exposition à des concentrations environnementales et permettre de prioriser les composés à être évalués.

Mots clés : ecdystéroïdes, acide rétinoïque, *Daphnia magna*, spectrométrie de masse en tandem, analyse de traces, évaluation du risque environnemental

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier le professeur Pedro A. Segura de m'avoir accordé sa confiance et permis d'amorcer le développement de l'un de ses thèmes de recherche soit celui de nouvelles méthodes d'évaluation du risque environnemental d'exposition à des contaminants d'intérêt émergents par des approches métabolomiques. Je le remercie de m'avoir laissé libre d'étudier le sujet sans contrainte, pour sa disponibilité et pour son soutien. Je remercie également la professeure Viviane Yargeau pour sa vivacité d'esprit et ses commentaires réfléchis qui ont su bonifier ma réflexion.

Ensuite, je voudrais remercier mes collègues dans le groupe Segura pour les discussions pertinentes ou non au sujet de la chimie, de la vie, d'idée de recherche farfelue, de tout et de rien. Merci d'avoir maintenu un climat de travail respectueux et agréable dans le laboratoire.

Je remercie René Gagnon, maintenant coordonnateur des laboratoires du département de chimie pour les formations et le temps qu'il a su me donner, et ce, malgré son horaire chargé. Je le félicite pour l'obtention de ce nouveau poste et je pense que le département de chimie est privilégié de l'avoir.

Je voudrais aussi remercier mes parents de m'avoir encouragé et soutenu dans la poursuite de mes études et ma conjointe Éloïse Gagnon pour sa présence et son soutien moral.

Enfin, merci aux organismes subventionnaires le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et la Faculté des sciences de l'Université de Sherbrooke sans qui ce travail n'aurait pas pu se concrétiser.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	vii
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. ÉLEVAGE, MÉTABOLISME ET ENDOCRINOLOGIE DE LA PUCE	
D'EAU	5
1.1. Description générale de la puce d'eau	5
1.2. Culture de la <i>D.magna</i>	6
1.3. Culture de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	7
1.4. Endocrinologie de la daphnie.....	9
1.4.1. Ecdystéroïdes	9
1.4.2. Terpénoïdes	13
1.4.3. Complexe EcR RXR	14
CHAPITRE 2. NOTIONS THÉORIQUES DE CHIMIE ANALYTIQUE.....	15
2.1. Chromatographie liquide.....	15
2.1.1. Colonne analytique à cœur solide	15
2.2. Spectrométrie de masse en tandem	17
2.2.1. Ionisation par électronébulisation	17
2.2.2. Spectromètre de masse en tandem	18
2.2.3. Analyseur quadripolaire	18
2.2.4. Cellule de fragmentation	21
2.3. Validation d'une méthode analytique	22
2.3.1. Exactitude et précision	22
2.3.2. Sélectivité.....	23
2.3.3. Stabilité.....	23
2.3.4. Méthodologie utilisée.....	24

CHAPITRE 3. QUANTIFICATION DES ECDYSTEROÏDES ET ACIDES

RÉTINOÏQUES CHEZ LA PUCE D'EAU	25
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Material and methods.....	31
3.1. Reagents and chemicals	31
3.2. Culture of <i>Daphnia magna</i>	32
3.3. Sample preparation.....	32
3.3.1. Extraction and derivatization	32
3.3.2. Quantitative analysis by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry	33
3.4. Method validation	36
3.4.1. Matrix effects, and recovery.....	36
3.4.2. Accuracy, precision, lower limit of quantification and limit of detection	36
3.4.3. Stability	37
Results and discussion	37
3.5. Optimization of sample preparation.....	37
3.6. Optimization of liquid chromatography.....	40
3.7. Method validation	44
3.7.1. Matrix effects, recovery and stability.....	44
3.7.2. Accuracy and precision and lower limit of quantification (LLOQ).....	45
3.7.3. Analysis of ecdysteroids and retinoic acids in <i>D. magna</i> cultures	48
Conclusion	51
Acknowledgements.....	51
References.....	52
Supplementary material	54
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	62
BIBLIOGRAPHIE.....	65
ANNEXE I.....	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Élimination des contaminants d'intérêt émergents par traitement de boue activée, concentrations résiduelles dans l'effluent et test d'écotoxicité sur la puce d'eau (<i>D. magna</i>) valeurs tirées de l'US-EPA [1] et [2].....	1
Tableau 2. Condition de culture pour la puce d'eau (<i>D. magna</i>).....	6
Tableau 3. Milieu de culture utilisé (Standard Freshwater) pour la culture en laboratoire de la puce d'eau	7
Tableau 4. Condition de culture de l'algue <i>Raphidocelis subcapitata</i>	7
Tableau 5. Composition du milieu Bold modified basal freshwater nutrient (B5282) solution utilisé pour la culture de l'algue <i>Raphidocelis subcapitata</i>	8
Tableau 6. Séquences génétiques codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des ecdystéroïdes via le cytochrome P450.....	9
Tableau 7. Les différentes fonctions de contrôles possibles avec un analyseur quadripolaire de type tandem.....	20
Tableau 8 UPLC method parameters for the quantification of ecdysteroids and retinoic acids.	33
Tableau 9. ESI source and mass spectrometer parameters for the quantification of ecdysteroids and retinoic acids using the SRM mode.	35
Tableau 10 Matrix effects, relative recovery, intra- and interday accuracy and precision for low, medium and high QC samples.	47
Tableau 11 Linearity of calibration curves, limits of quantification and detection for ecdysteroids and retinoic acids.	47
Tableau 12 Stability, quantified as bias percentage at -20°C for low, medium and high QC samples.	48
Tableau 13 Laboratory-cultured ecdysteroids and retinoic acids levels in <i>D. magna</i> . Concentrations are reported in pg per individual. Concentrations are reported in pg per individual.	50

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Femelle <i>Daphnia magna</i>	Figure 2. Epphipia de <i>D. magna</i>	5
Figure 3. Schéma de la synthèse des ecdystéroïdes chez les crustacés adapté de Mykles (2011), Lachaise et al. (1993) et Wang, Spaziani (2000) [14,17–19].....		11
Figure 4. Fluctuation approximative "équivalent immunologique" des ecdystéroïdes chez la daphnie adulte pendant un cycle de parthénogénèse adapté de Martin-Creuzberg (2007) [6]		12
Figure 5. Structure des terpénoïdes se liant au RXR ou à l'USP.....		13
Figure 6. Schématisation du mode d'action d'un récepteur nucléaire		14
Figure 7. Schéma du processus d'ionisation en mode positif par électronébulisation		17
Figure 8. Schéma simplifié d'un spectromètre de masse en tandem avec un mode d'ionisation par électronébulisation. Le trajet des ions est représenté en rouge.....		18
Figure 9. Stabilité d'ions dans un analyseur quadripolaire.....		19
Figure 10. Schématisation de la relation entre sélectivité et signal au bruit pour un analyseur quadripolaire vs un simple quadripôle (<i>Fred W. McLafferty, circa 1980</i>).....		21
Figure 11. Schéma simplifié de la cellule de collision sur un spectromètre de masse en tandem.....		22
Figure 12. Illustration classique des concepts d'exactitude et de précision.....		23
Figure 13 Derivatization of 300 pg and 500 pg mL ⁻¹ of 6-keto ecdysteroids		40
Figure 14 Chromatographic comparison between porous C ₁₈ column (A) and solid-core C ₁₈ column (B) using identical chromatographic gradient. 20-E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A.		42
Figure 15 Optimization of mobile phase additives and ionization conditions.....		43
Figure 16 Representative chromatograms of ecdysteroids (20-E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A) and retinoic acids (RA) levels in <i>D. magna</i>		49
Figure 17 Targeted ecdysteroids and retinoic acids.....		55
Figure 18 Additional purification of makisterone A (Mak A).....		56
Figure 19 Initial sensitivity assessment of the Quattro Premier using 0.1% AA as solvent A and ESI +/- polarity switch.		57

Figure 20 Derivatization of ecdysteroids by hydroxylamine hydrochloride in acidic conditions (pH = 2.7).	58
Figure 21 Comparison between chromatographic separations of derivatized ecdysteroids (A) and underivatized form (B) using identical chromatographic gradients.	59
Figure 22 Quantification of remaining underivatized ecdysteroids in a fortified matrix blank.....	60
Figure 23 Matrix effects (ME) comparison by post column infusion technique of internal standard and analytes in mobile phase (black line) versus matrix blank (red line):	61

INTRODUCTION

La présence de contaminants d'intérêt émergent (CIE) (produits pharmaceutiques, et de soin personnel, retardateur de flammes, plastifiants, etc.), transportés dans les milieux aquatiques via les rejets de station d'épuration, est une situation qui est préoccupante au niveau mondial pour la santé humaine et aquatique. L'élimination de ces composés avant l'introduction dans le milieu récepteur relève entièrement du ressort des stations d'épurations. Toutefois, une récente revue de la littérature portant sur le traitement des contaminants d'intérêt aux États-Unis, au Canada et en Europe effectuée par l'United State Environmental Protection Agency (US-EPA) souligne que l'élimination de CIE ne faisait pas partie des préoccupations lors de la conception initiale des stations d'épurations [1]. Comme le démontre une partie des valeurs recueillies dans cette banque de données (Tableau 1), une station de traitement des eaux usées par traitement de boue activée (traitement le plus répandu) possède une certaine efficacité d'élimination des CIE.

Tableau 1. Élimination des contaminants d'intérêt émergents par traitement de boue activée, concentrations résiduelles dans l'effluent et test d'écotoxicité sur la puce d'eau (*D. magna*) valeurs tirées de l'US-EPA [1] et [2]

Contaminants d'intérêt émergents (CIE)	Eaux usées municipales		Test de toxicité <i>D.magna</i>	
	Élimination moyenne (%)	Concentration moyenne de l'effluent	OECD 202	OECD 211
	Moyenne	ng L ⁻¹	LC ₅₀ ou EC ₅₀ (48h)	NOEC (21 jours)
Bisphénol A	78	190	12.8 mg/L	30 ug/L
Carbamazepine	22	624	111 mg/L	NR
DEET	54	85	NR	>1 mg/L
Diclofenac	44	1808	56600 ug/L	10000 ug/L
Estradiol	88	3	2.97 mg/L	270 µg/L
Ibuprofen	90	1090	124400 ug/L	1230 ug/L
Iopromide	69	6122	NR	> 1000000 ug/L
Naproxène	85	1274	> 32 ug/L	NR
Nonylphénol	90	1510	0.18 mg/L	130 ug/L
Sulfamethoxazole	58	639	234180 ug/L	1110 ug/L
Triclosan	89	173	390.0 ug/L	200.0 ug/L

NR: valeur non rapportée dans la littérature scientifique

Néanmoins, dans la majorité des cas l'élimination moyenne des CIE n'est que partielle (22 à 90 % dans le cas des 11 CIE choisis, voir tableau 1), ce qui provoque l'introduction dans le milieu récepteur de milliers de composés de concentrations moyennes variables (3 - 6122 ng L⁻¹ dans le cas des 11 CIE choisis, voir tableau 1) formant un mélange dont les effets sur les organismes non ciblés (crustacés et poissons) sont largement inconnus.

L'évaluation du risque environnemental d'exposition à des contaminants pour le milieu aquatique est le plus souvent effectuée sur des espèces telles que la puce d'eau (*D.magna*) par des tests de toxicité aiguë 24-48 h sur les néonates (*D.magna*) (OECD 202) et de l'impact sur la reproduction sur 21 jours (OECD 211), ces valeurs pour certains CIE cibles sont rapportées dans le tableau 1. Bien que plusieurs autres organismes puissent être utilisés pour évaluer ce risque, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, *D. pulex*, *Artemia salina*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinas fontinalis*, *Americamysis bahia*, *Holmesimysis costata*, *Cyprinodon variegatus*, *Menida menidia*, *M. beryllina*, and *M. peninsulae* [3], les valeurs de toxicité rapportées, toutes espèces confondues, sont similaires.

Comme les concentrations de CIE dans les eaux de surface sont de l'ordre du nanogramme par litre au bas microgramme par litre, il est peu probable qu'une toxicité aiguë soit observée après 21 jours. Cependant, il est prouvé qu'une exposition prolongée à de faibles niveaux peut causer des effets sublétaux et provoquer des changements comportementaux. Quelques études ont démontré ce point pour des concentrations inférieures à 100 ng L⁻¹ pour le 17 α -éthynylestradiol [4], l'ibuprofène et le ciprofloxacine [5]. Il est évident que les méthodes actuelles d'évaluation de risque ne sont pas suffisamment sensibles pour déceler les effets provoqués par une exposition chronique à de faibles concentrations et doivent être améliorées.

L'hypothèse principale de cette recherche est qu'un test d'évaluation du risque écotoxicologique utilisant un point de terminaison métabolique serait plus sensible que les points de terminaison actuels (mort, immobilité (OECD 202), perturbation de la reproduction (OECD 211)) et capable de déceler ces effets sublétaux. Afin de pouvoir tester cette hypothèse, une méthode visant

l'étude d'un ou plusieurs métabolismes essentiels à la survie d'un organisme clé dans les eaux de surfaces devra être développée.

Parmi les différents organismes appropriés pour réaliser cette étude, la puce d'eau (*D.magna*) a été choisie puisqu'elle est déjà très utilisée en laboratoire, se reproduit rapidement, est relativement facile à cultiver, contrôle la prolifération d'algues en s'alimentant sélectivement de certaines espèces et est source d'alimentation pour plusieurs espèces de petits poissons. Cette espèce se retrouve dans les lacs, rivières et étangs temporaires de l'hémisphère nord, il s'agit donc d'un modèle idéal pour amorcer une étude visant à évaluer le risque écotoxicologique d'exposition à des contaminants émergents. En effet, bien que l'utilisation de l'espèce *D. magna*, limiterait l'applicabilité de ces résultats à l'hémisphère nord, le genre *Daphnia* comporte plus de 100 espèces proliférant dans une variété de condition climatique dont notamment l'hémisphère sud (quelques espèces) ce qui pourrait permettre d'étendre la portée des résultats. De plus, le métabolisme de la puce d'eau a été suffisamment étudié dans la littérature scientifique pour que certaines classes de molécules puissent être ciblées comme potentiels marqueurs (biomarqueurs).

Des études ont notamment démontré que les classes des ecdystéroïdes et terpénoïdes seraient impliquées dans les processus clés à la survie de la daphnie tels que la mue, la reproduction et la détermination du sexe [6–9]. Une revue de la synthèse et du rôle biologique de ces deux classes de molécules chez les crustacées et insectes est présentée dans la section 1.4 de ce mémoire. Une sélection de 4 métabolites (20-hydroxyecdysone, ecdysone, ponasterone A et acide rétinolique) retrouvés et isolés chez plusieurs espèces de crustacées, insectes et plantes a été effectuée. Une forte conservation de ses métabolites chez plusieurs espèces renforce l'idée qu'elles ont un rôle essentiel pour l'organisme. Enfin, un article de Leblanc [10] montre qu'une inhibition des niveaux d'équivalents d'ecdystéroïdes (immuno-ecdystéroïdes) chez les néonates (*D.magna*) survient à la suite d'une exposition à des concentrations de 497 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenarimol, un fongicide utilisé pour contrôler l'oïdium (maladie du blanc) provoquée par certains champignons.

L'objectif de la recherche présentée dans ce mémoire est de développer une méthode d'extraction et de quantification de 3 ecdystéroïdes (20-hydroxyecdysone, ecdysone, ponasterone A) et des acides rétinoïques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Il s'agit d'une approche d'étude métabolomique dite ciblée. Une revue détaillée des méthodes analytiques parue dans la littérature et portant sur le sujet peut être trouvée dans le chapitre d'introduction de l'article inséré dans ce mémoire.

CHAPITRE 1. ÉLEVAGE, MÉTABOLISME ET ENDOCRINOLOGIE DE LA PUCE D'EAU

1.1. Description générale de la puce d'eau

La puce d'eau (*Daphnia magna*) est un petit crustacé (<5mm) (Figure 1) des eaux douces composant le zooplancton de la plupart des cours d'eau, étangs ou lacs. Elle joue un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques en s'alimentant sélectivement de certaines algues, contrôlant ainsi la densité de celle-ci, et en servant de source d'alimentation aux poissons et aux alevins [11].



Figure 1. Femelle *Daphnia magna*



Figure 2. Ephippia de *D. magna*

La puce d'eau se reproduit par parthénogenèse lorsque les conditions sont favorables, dans ce mode de reproduction les femelles engendrent asexuellement une progéniture femelle génétiquement identique. En condition défavorable, la puce d'eau changera de mode de reproduction pour une mode sexué, des facteurs environnementaux connus tels que le manque de nourriture, la diminution de la photopériode et la surpopulation sont connus comme initiateurs du mode de reproduction sexuée. La production de mâles donnera lieu à la formation d'un œuf à l'enveloppe dure appelé ephippium (singulier de ephippia) (Figure 2) capable de survivre à des conditions extrêmes comme le gel et la sécheresse [9]. Pendant son cycle de vie, la daphnie femelle adulte produit tous les 3-4 jours en moyenne entre 6 et 10 néonates [3,12]. Lors de la ponte, la femelle expulse d'abord les néonates, puis mue et enfin pond une nouvelle génération d'œufs qui après éclosion donneront des néonates.

1.2. Culture de la *D.magna*

La culture en laboratoire est décrite dans plusieurs publications [13]. En général, les conditions de cultures sont similaires, cependant quelques différences peuvent survenir. Aussi, les tableaux 2 et 3 qui suivent résument les conditions utilisées pour la culture de l'élevage dans le cadre de la recherche présentée dans ce mémoire.

Tableau 2. Condition de culture pour la puce d'eau (*D. magna*)

Condition de culture	
Organisme	<i>Daphnia magna</i> Straus
Densité de population	40 individus/litre
Alimentation	Algue <i>Raphidocelis subcapitata</i>
Température de culture	25 ± 2 °C
Milieu de culture	Standard Freshwater
Volume	1 litre
Renouvellement du milieu	1 fois semaine
Intensité lumineuse	600 lux
Photopériode	16 h lumière, 8 h obscurité
Oxygénation	Bullage continu

Tableau 3. Milieu de culture utilisé (Standard Freshwater) pour la culture en laboratoire de la puce d'eau

Sel inorganique	Concentration (40X) (un seul sel)* gL^{-1}	Concentration (1X)* mgL^{-1}
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11.76	294.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.93	123.3
NaHCO ₃	2.59	64.8
KCl	0.23	5.8

* Dilution dans l'eau MilliQ 18.2 M Ω

1.3. Culture de *Raphidocelis subcapitata*

La culture de l'algue *Raphidocelis subcapitata* servant de source d'alimentation pour l'élevage de *D.magna* est effectuée dans un milieu Bold modified basal freshwater nutrient. Les conditions de culture sont décrites dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4. Condition de culture de l'algue *Raphidocelis subcapitata*

Condition de culture	
Organisme	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
Température de culture	Pièce
Milieu de culture	Bolds modified medium
pH	6.6
Volume	500 mL à 1 litre
Repiquage	Aux 10-14 jours
Intensité lumineuse	600 lux
Photopériode	Continue
Oxygénation	Agitation continue (agitateur magnétique)

Tableau 5. Composition du milieu Bold modified basal freshwater nutrient (B5282) solution utilisé pour la culture de l'algue *Raphidocelis subcapitata*

Composé	Concentration (1X)
	mgL ⁻¹
NaNO ₃	250
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
EDTA	50
KOH	31
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98
H ₂ SO ₄ conc.	1.0 mL ⁻¹
H ₃ BO ₄	11.42
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82
MnCl ₂ ·H ₂ O	1.44
MoO ₃	0.71
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49
NiCl ₂	0.0015
Na ₂ SeO ₄	0.002
SnCl ₄	0.001
KI	0.003
VO ₂ SO ₄ ·2H ₂ O	0.002

1.4. Endocrinologie de la daphnie

L'information sur l'endocrinologie des crustacés est relativement peu nombreuse et le plus souvent obtenue sur des espèces d'intérêt commercial comme le crabe, le homard, la crevette [9] ou encore d'autres membres de la grande famille des arthropodes comme les insectes. Quelques classes de molécules sont reconnues comme étant impliquées dans le contrôle endocrinologique, on y retrouve notamment les ecdystéroïdes, les terpénoïdes et les peptides.

1.4.1. Ecdystéroïdes

Chez les insectes et les crustacés, la synthèse d'ecdystéroïdes est effectuée à partir du cholestérol, obtenu via l'alimentation, par une série d'enzyme appartenant au complexe du cytochrome P450. Ces enzymes sont codés par une série de gènes appelés les gènes Halloween (*Halloween genes*), isolée pour la première fois chez la drosophile (*D. melanogaster*) par Wieschaus et Nusslein-Volhard (Prix Nobel en Physiologie ou Médecine 1995) et collaborateurs. La spécificité du complexe enzymatique du cytochrome P450 fait en sorte que l'hydroxylation ne se produit que dans l'ordre suivant : $C_{25} \rightarrow C_{22} \rightarrow C_2 \rightarrow C_{20}$ [14]. (Figure 3).

Tableau 6. Séquences génétiques codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse des ecdystéroïdes via le cytochrome P450

Séquence génétique	Fonction de l'enzyme
<i>Neverland</i>	7,8-déhydrogénase
(Black box) <i>Shroud</i> <i>Spook</i> <i>Spookier</i> <i>Spookiest</i>	Conversion du 7-dehydrocholesterol en $\Delta(4)$ -dicetol
<i>Phantom</i>	25-Hydroxylase
<i>Disembodied</i>	22-Hydroxylase
<i>Shadow</i>	2-Hydroxylase
<i>Shade</i>	20-Hydroxylase

Les ecdystéroïdes synthétisés sont par la suite transportés par l'hémolymph, le liquide circulatoire des arthropodes, vers les tissus pour, par la suite, se lier au récepteur nucléaire de l'ecdysone (EcR) qui se lie ensuite sur une séquence nucléotidique et active ensuite la transcription des gènes cibles de l'ecdysone situés dans le noyau. L'organe responsable de la synthèse des ecdystéroïdes n'est pas identifié chez les microcrustacés comme *D.magna*, mais des orthologues (gènes homologues provenant d'une même souche ancestrale), des gènes *neverland* et *shade* ont pu être clonés à partir de leur séquence génétique [15]. Cinq gènes orthologues ont également été découverts chez la *Daphnia pulex* : *spook*, *phantom*, *disembodied*, *shadow* et *shade* [16].

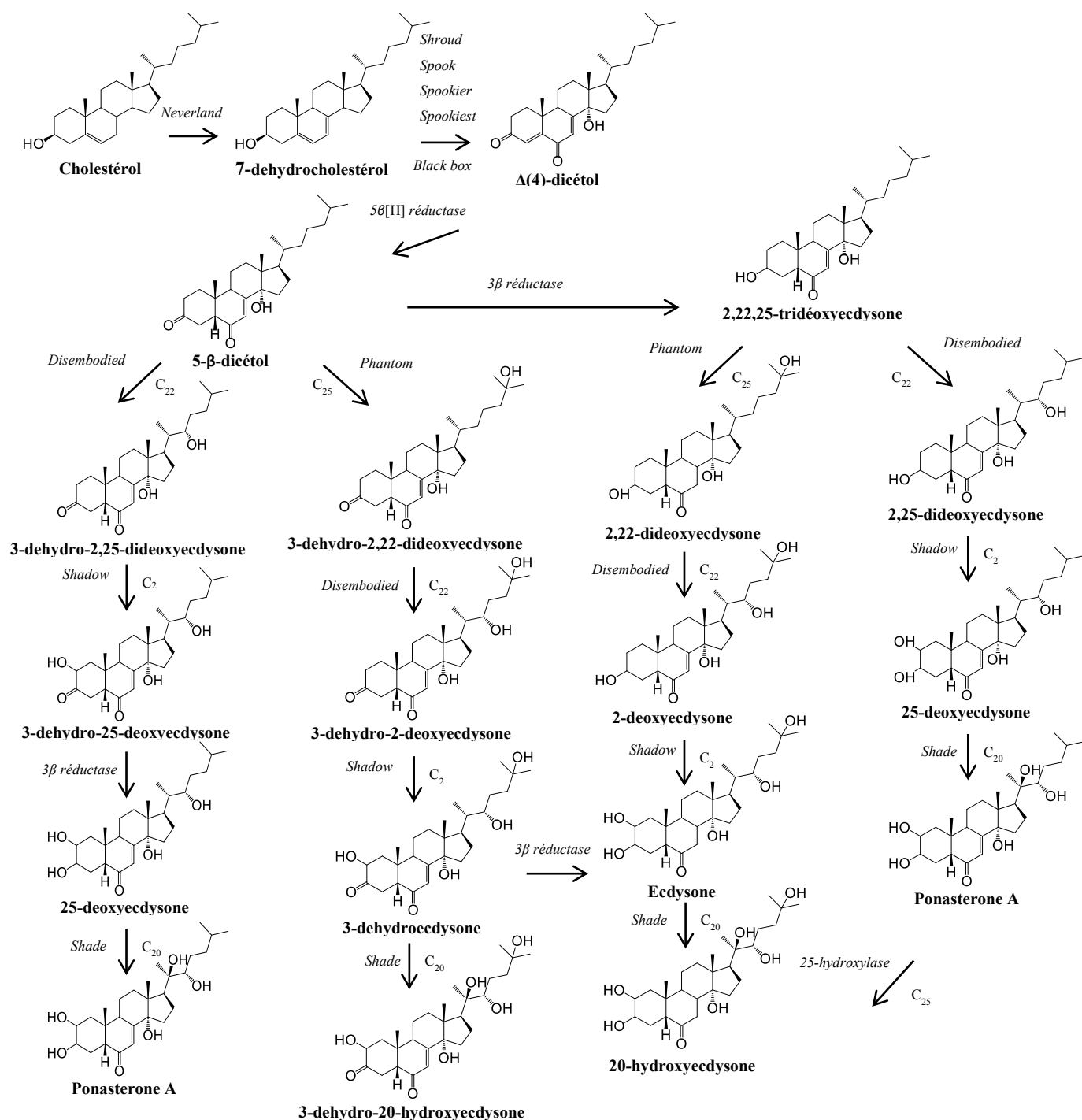


Figure 3. Schéma de la synthèse des ecdystéroïdes chez les crustacés adapté de Mykles (2011), Lachaise et al. (1993) et Wang, Spaziani (2000) [14,17–19]

Les ecdystéroïdes sont impliqués dans les processus vitaux comme la mue et l'ovulation de la puce d'eau. Les niveaux d'ecdystéroïdes augmentent puis diminuent sur un cycle de reproduction chez *D. magna* [6,10] (Figure 4). La diminution des ecdystéroïdes donne lieu à la mue et l'ovulation et ceci est démontré par une inhibition complète de l'ovulation et de la mue lorsque la quantité de 20-hydroxyecdysone est maintenue élevée par un ajout dans le milieu de culture [15].

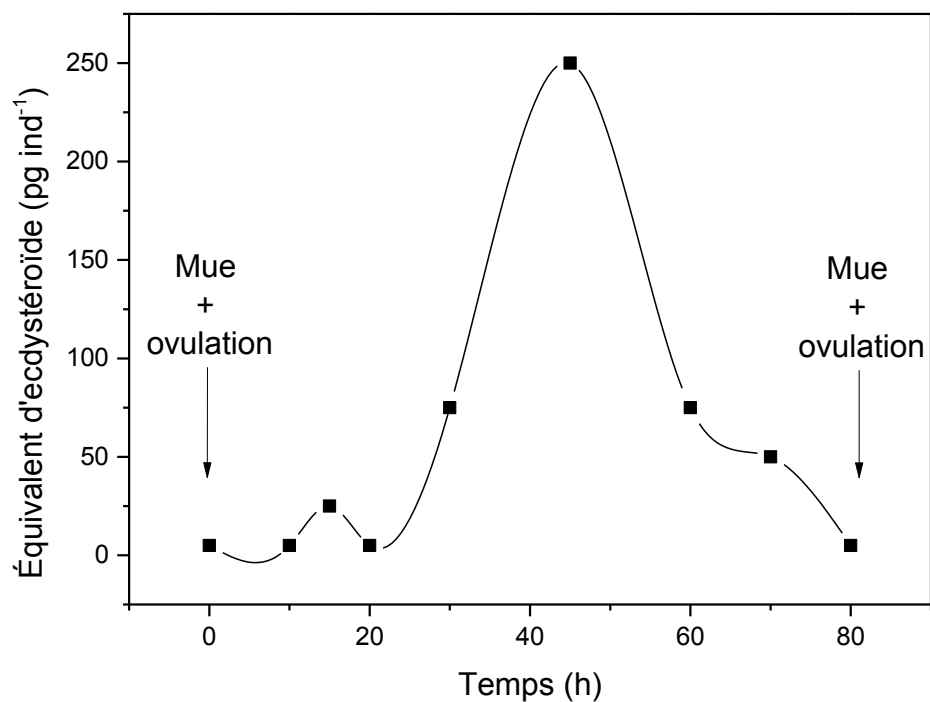


Figure 4. Fluctuation approximative "équivalent immunologique" des ecdystéroïdes chez la daphnie adulte pendant un cycle de parthénogénèse adapté de Martin-Creuzberg (2007) [6]

1.4.2. Terpénoïdes

Le terme terpénoïdes est fréquemment utilisé pour désigner une classe de présumées hormones comprenant l'acide rétinoïque, les hormones juvéniles et le méthylfarnesoate. Puisque ces molécules présentent un niveau variable d'efficacité de liaison au récepteur X des rétinoïdes (RXR) chez les crustacés ou son orthologue l'ultraspiracle (USP) chez les insectes, elles sont suspectées d'agir à titre d'hormone.

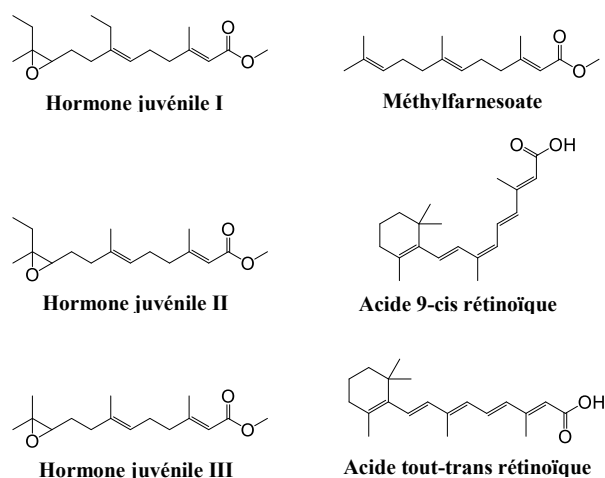


Figure 5. Structure des terpénoïdes se liant au RXR ou à l'USP.

Une séquence génétique orthologue du RXR a pu être clonée chez la daphnie [20]. Bien que l'identité du ligand soit encore un sujet controversé dans la littérature scientifique, des effets physiologiques ont pu être démontrés lors de l'administration exogène de certains composés. C'est notamment le cas de l'exposition au méthylfarnesoate qui détermine le sexe des néonates lorsqu'une femelle *D. magna* adulte y est exposée avant l'ovulation [21]. L'exposition au pyriproxyfène and méthoprène (analogues d'hormones juvéniles) induit des anomalies de développement chez l'embryon [22]. Les hormones juvéniles contrôlent chez tous les insectes la métamorphose et la reproduction [23]. Finalement, chez l'homme l'acide rétinoïque est un facteur important dans le développement des membres, cristallin, poumon, système nerveux central, mais aussi dans la reproduction, le cancer, les naissances prématurées, etc.[24]

1.4.3. Complexe EcR RXR

Le complexe EcR-RXR fait partie de la catégorie des récepteurs nucléaires, cette classe de récepteur est connue comme capable de se lier à l'ADN et d'activer la transcription de gènes dans le noyau.

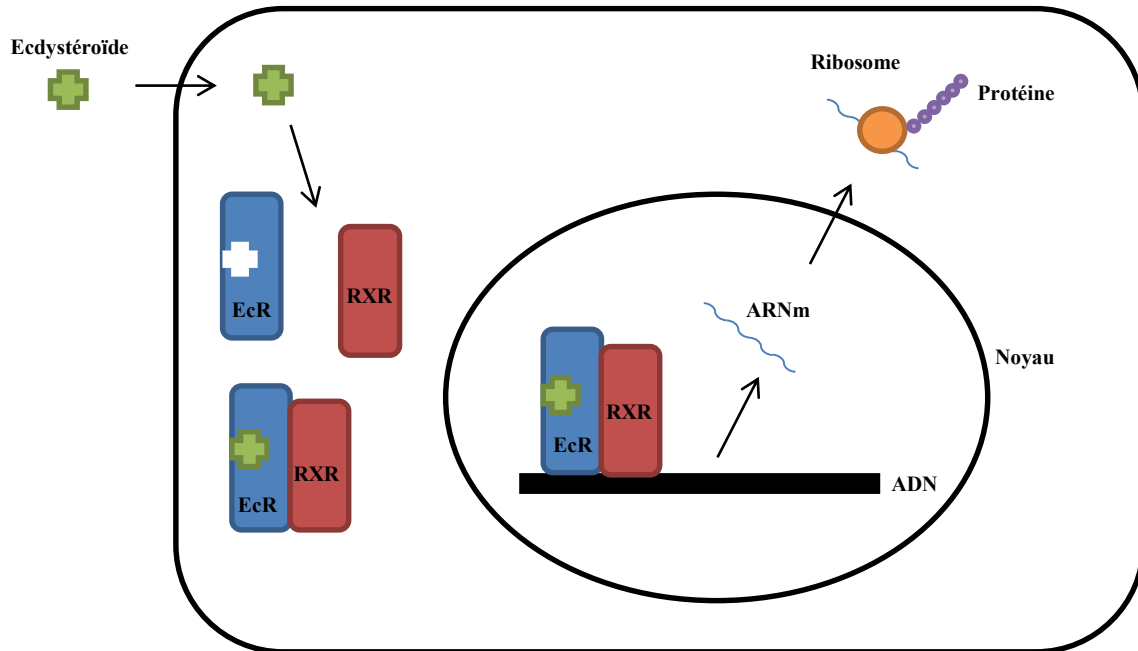


Figure 6. Schématisation du mode d'action d'un récepteur nucléaire

Les ecdystéroïdes synthétisés circulent dans l'hémolymph et pénètrent les cellules des tissus périphériques pour se lier au récepteur des ecdystéroïdes (EcR). Le récepteur des acides rétinoïques (RXR) se lie avec ou sans son ligand avec le récepteur des ecdystéroïdes. Ensemble, il forme un hétérodimère capable de se lier sur l'ADN et amorcer la transcription de gènes cibles.

CHAPITRE 2. NOTIONS THÉORIQUES DE CHIMIE ANALYTIQUE

2.1. Chromatographie liquide

Le fonctionnement d'un appareil de chromatographie liquide est généralement bien compris et ne nécessite pas d'explication approfondie. Il se compose d'un système de pompe capable de délivrer un débit variable de différents solvants (phase mobile) ce qui permet d'obtenir une séparation chromatographique au sein d'une colonne de séparation contenant des particules de silices poreuses (phase stationnaire). La séparation s'effectue lors du partage de l'analyte entre la phase stationnaire et la phase mobile. Les sections ci-dessous traiteront toutefois des concepts nécessaires à la compréhension de l'efficacité des colonnes possédant des particules à cœur solides, puisqu'il s'agit d'une technologie relativement nouvelle et qu'elle est utilisée dans cette étude. Ce type de colonne chromatographique a pu apporter des améliorations significatives (voir Chapitre 3, *Optimization of liquid chromatography*) à la séparation des isomères ciblés.

2.1.1. Colonne analytique à cœur solide

Le développement de colonne à cœur solide est relativement nouveau, bien que l'idée ne soit pas nouvelle et initialement suggérée en 1969 par Horváth et Lipsky [25]. Ce type de colonne démontre une efficacité de 39 % supérieure aux colonnes de silice complètement poreuse [26]. L'équation de Van Deemter exprime l'efficacité de séparation d'une colonne chromatographique comme suit :

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + Cu \quad [1.1]$$

où

u : vitesse moyenne de la phase mobile

A : diffusion d'Eddy

B : diffusion longitudinale

C : résistance au transfert de masse

A – Diffusion d'Eddy

Chaque molécule dans la phase mobile emprunte un trajet aléatoire à travers la phase stationnaire. Ceci provoque l'élargissement des pics puisque les différents trajets sont de différentes longueurs. Ce paramètre est influencé principalement par la distribution de taille des particules de la phase stationnaire et par les inhomogénéités dans la phase stationnaire.

B – Diffusion longitudinale

Une bande d'analyte aura tendance à diffuser dans toutes les directions en raison d'un gradient de concentration au pourtour de la bande près de la phase mobile. La conformation tubulaire d'une colonne analytique fait en sorte que l'effet de cette diffusion est principalement observé le long de l'axe du flux : elle est donc nommée diffusion longitudinale.

C – Résistance au transfert de masse

Ce terme exprime la différence de temps nécessaire pour qu'un analyte atteigne l'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire. Considérant une phase stationnaire poreuse, la résistance au transfert de masse peut être vue comme la différence de trajet emprunté dans les pores de la particule par différentes molécules de l'analyte. Cette différence de trajet entraîne une différence de temps et donc un élargissement du pic chromatographique.

L'avantage que possède une colonne de particules à cœur solide sur une colonne de particules de silice poreuse serait dû à une diminution des facteurs de diffusion longitudinale (B) et de diffusion d'Eddy (A). Selon la littérature publiée à ce sujet, la modification de la résistance au transfert de masse contribuerait très peu à l'amélioration de la performance analytique de la colonne pour de petites molécules. En effet, bien que la résistance au transfert de masse soit moindre puisque la différence de trajet emprunté à l'intérieur de la particule est moins grande en raison du cœur solide, l'ordre de grandeur des facteurs reste similaire et ne permet pas d'expliquer la différence d'efficacité. C'est plutôt la diminution de la diffusion longitudinale provoquée par l'incapacité des analytes de diffuser à travers la particule solide ainsi que la diminution du facteur de diffusion d'Eddy qui serait plus faible en raison d'une distribution plus serrée de la taille des particules qui expliqueraient ce phénomène [27].

2.2. Spectrométrie de masse en tandem

2.2.1. Ionisation par électronébulisation

L'ionisation par électronébulisation a été utilisée dans ce projet pour permettre la production en phase gazeuse d'un ion à partir des analytes ciblés. Le fonctionnement de cette source d'ionisation est décrit dans le paragraphe suivant. L'ionisation s'effectue en trois étapes (Figure 7). Elles sont : (a) la production de gouttelettes chargées près de l'extrémité du capillaire d'électronébulisation (Taylor cone); (b) l'évaporation du solvant et réduction de la taille des gouttelettes chargées pour finalement atteindre la taille suffisante pour produire des ions en phase gazeuse; (c) et finalement le mécanisme d'ionisation par lequel l'ion est créé. Trois mécanismes d'ionisation sont débattus dans la littérature : (1) modèle d'évaporation d'ions (*ion evaporation model*); (2) modèle de charge résiduelle (*charge residue model*); (3) modèle d'éjection en chaîne (*chain ejection model*). L'étude de ces mécanismes d'ionisation n'est pas pertinente pour la compréhension de ce mémoire, pour une étude plus complète sur le sujet voir [28].

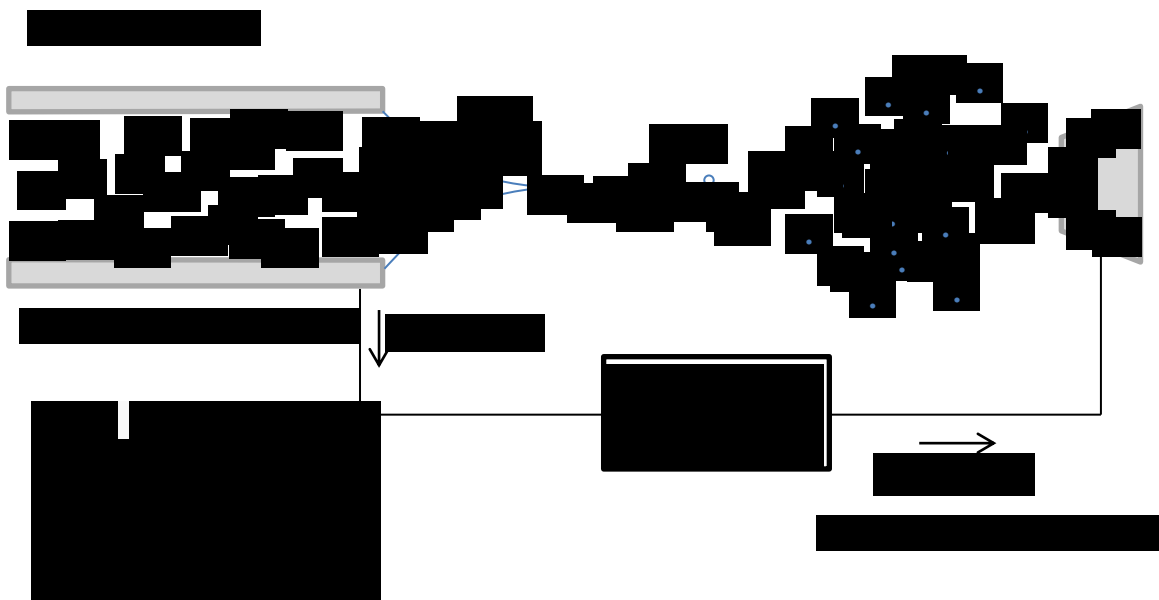


Figure 7. Schéma du processus d'ionisation en mode positif par électronébulisation

2.2.2. Spectromètre de masse en tandem

Le spectromètre de masse en tandem aussi appelé triple quadripôle (QqQ) est un type d'analyseur de masse qui se compose d'un premier analyseur quadripolaire (Q1) suivi d'une cellule de collision (q2) et d'un second analyseur quadripolaire (Q3). Ce type d'analyseur de masse est utilisé conjointement avec un module permettant la production en phase gazeuse d'ions. Le mode d'ionisation le plus répandu est l'électronébulisation (ESI). L'ensemble (ESI-QqQ-MS), permet à une molécule ionisée produite par électronébulisation issue d'un chromatographe en phase liquide d'être d'abord sélectionnée à l'aide d'un premier analyseur quadripolaire de se faire fragmenter dans la cellule de collision pour produire un deuxième ion, issu du premier, qui sera sélectionné dans le deuxième analyseur quadripolaire pour enfin être envoyé sur un détecteur qui amplifiera le signal et effectuera la conversion en signal électrique.

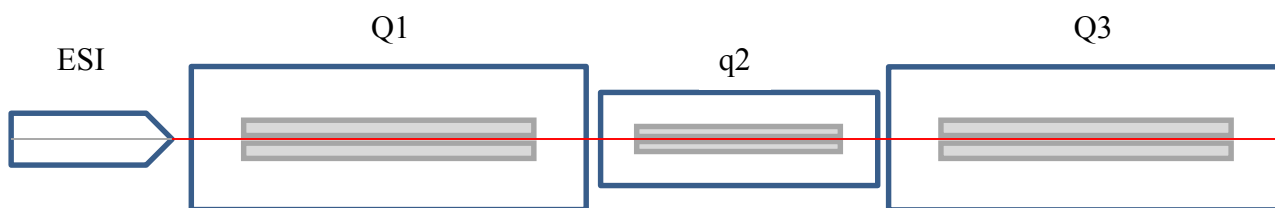


Figure 8. Schéma simplifié d'un spectromètre de masse en tandem avec un mode d'ionisation par électronébulisation. Le trajet des ions est représenté en rouge.

2.2.3. Analyseur quadripolaire

Un analyseur quadripolaire se compose de deux séries de tiges métalliques cylindriques (électrodes) sur laquelle sont appliqués par paire un courant continu et un courant alternatif qui s'alterne périodiquement à une fréquence typique de 1 à 2 MHz. La solution mathématique pour traiter le comportement d'ions traversant un analyseur quadripolaire provient de l'équation de Mathieu présentée ci-dessous.

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad a_u = \frac{8eU}{mr_0^2\Omega^2} \quad q_u = \frac{4eV}{mr_0^2\Omega^2} \quad [1.2]$$

u : coordonnées en x, y et z.

ξ : $\frac{\Omega t}{2}$

m : masse de la particule (ion)

U : courant continu

V : courant alternatif

r_0 : distance entre le centre des quatre tiges (quadripôles) et la surface d'une tige

e : charge de la particule (ion)

Ω : fréquence radiale de l'électrode circulaire d'entrée

La solution de cette équation produit un digramme de stabilité. Dans ce diagramme est représentée la première zone de stabilité de la trajectoire d'un ion dans un analyseur quadripolaire. Ce diagramme est représenté dans la figure 9.

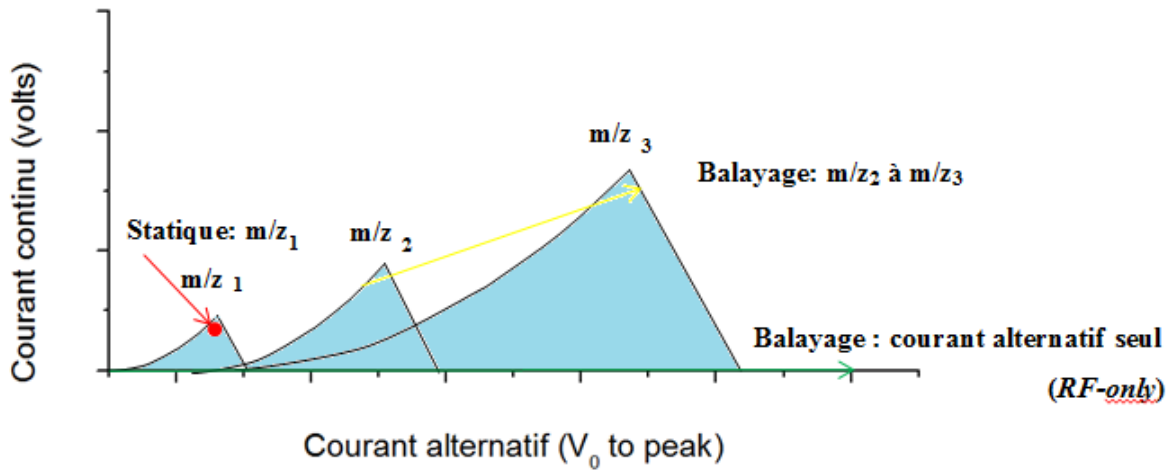


Figure 9. Stabilité d'ions dans un analyseur quadripolaire.

En vert, le mode de balayage en mode RF-only ou courant alternatif seul; en jaune, un balayage des m/z d'une valeur (m/z_2) à une autre (m/z_3); en rouge, le mode statique sur le m/z_1 . Les zones en bleus représentent les zones de stabilité des ions en x et en y dans l'analyseur quadripolaire.

La combinaison des différents modes illustrés dans la figure 9 donne lieu à plusieurs fonctions de contrôle sur un analyseur quadripolaire en tandem (MS functions) qui sont énumérées dans le tableau 7.

Tableau 7. Les différentes fonctions de contrôles possibles avec un analyseur quadripolaire de type tandem.

Mode de contrôle de l'analyseur (MS function)	Analyseurs quadripolaire 1 (Q1 ou MS1)	Cellule de collision (q2 ou MS2)	Analyseur quadripolaire 3 (Q3 ou MS3)
(MS) Balayage complet	Balayage : m/z à m/z	<i>RF-only</i>	<i>RF-only</i>
(MS) Mesure d'ions sélectionnés (<i>SIM</i>)	Statique	<i>RF-only</i>	<i>RF-only</i>
(MS-MS) Balayage produits	Statique	<i>RF-only</i> , gaz de collision	Balayage : m/z à m/z
(MS-MS) Balayage précurseurs	Balayage : m/z à m/z	<i>RF-only</i> , gaz de collision	Statique
(MS-MS) Perte neutre	Balayage : m/z à m/z	<i>RF-only</i> , gaz de collision	Balayage : m/z à m/z
(MS-MS) Mesure de réactions sélectionnées (<i>SRM</i>)	Statique	<i>RF-only</i> , gaz de collision	Statique

La fonction de balayage la plus utilisée pour le développement d'une méthode d'analyse quantitative dans un analyseur de type triple quadripôles est le mode de mesure de réactions sélectionnées (SRM) puisque ce mode permet une grande sélectivité (définition voir section 2.1.4.1), mais également un bon rapport signal au bruit. Le rapport signal au bruit est un indicateur de la qualité du signal transmis et de la capacité de distinguer un signal d'une interférence et donc de donner une idée de ce qui peut être quantifié ou non. L'ajout du second filtre de masse (QqQ) par rapport au simple quadripôle (Q) permet de réduire significativement les ions interférents (bruit) puisque la probabilité qu'une interférence isobarique (de mêmes rapports m/z) se fragmentant aux mêmes endroits et générant le même ion produit est réduite (Figure 10).

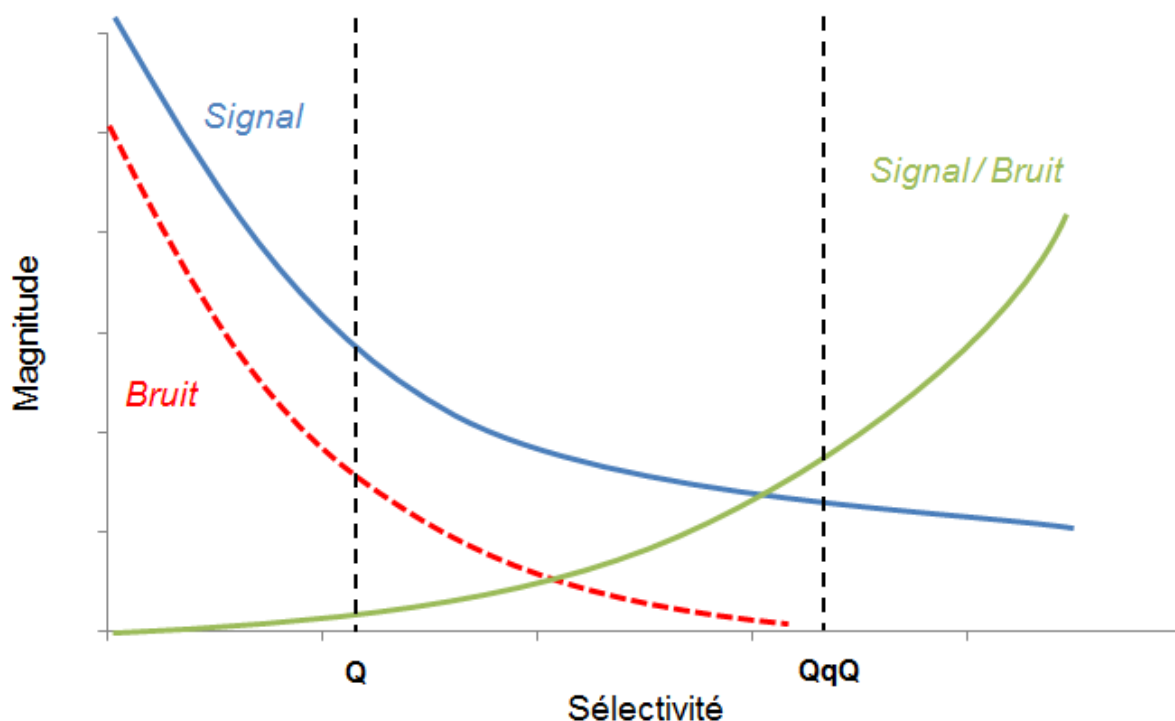


Figure 10. Schématisation de la relation entre sélectivité et signal au bruit pour un analyseur quadripolaire vs un simple quadripôle (*Fred W. McLafferty, circa 1980*).

2.2.4. Cellule de fragmentation

La collision d'un ion (précurseur) pour produire des ions secondaires (produits) est effectuée en faisant passer le faisceau d'ions issu du premier quadripôle à travers une cellule pressurisée avec un gaz neutre (3 mbar). La séquence d'événements est la suivante : l'ion entre en collision avec un atome de gaz rare (généralement Ar) ou une molécule de gaz inerte (généralement N_2), l'ion acquiert une énergie supplémentaire causée par la collision avec le gaz et entre dans un état excité, l'ion se dissocie en un fragment neutre et un ion secondaire.

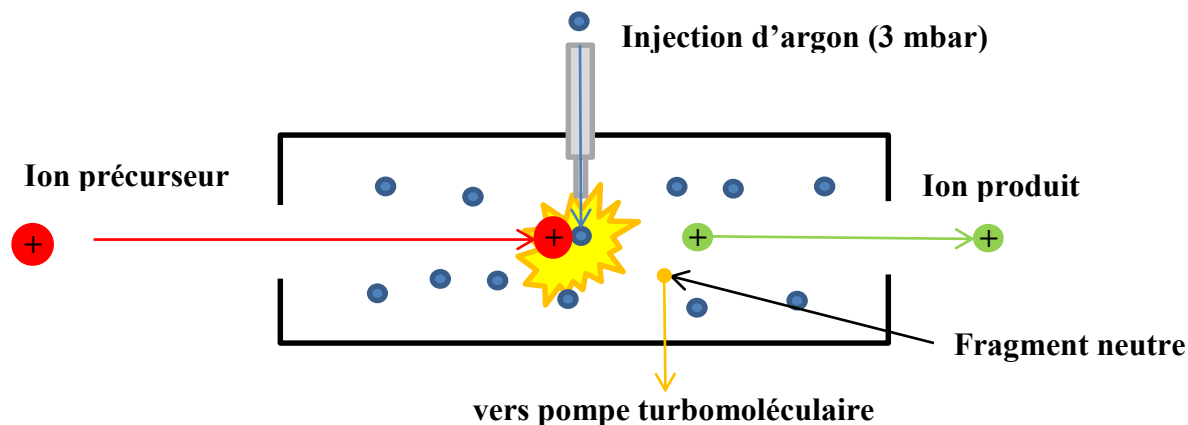


Figure 11. Schéma simplifié de la cellule de collision sur un spectromètre de masse en tandem

2.3. Validation d'une méthode analytique

Le terme validation analytique regroupe une série de critères qui confirment de façon objective qu'une méthode est fiable, reproductible, et atteint l'objectif spécifique pour laquelle elle a été créée. La validation d'une méthode analytique fait l'objet de plusieurs publications. Cependant, les exigences fondamentales sont similaires et doivent minimalement inclure les critères suivants :

- Exactitude
- Précision
- Sélectivité
- Stabilité

2.3.1. *Exactitude et précision*

L'exactitude est la mesure de l'étroitesse d'accord du résultat d'une mesure avec sa valeur de référence acceptée. Le calcul du biais sous la forme de l'erreur relative est normalement calculé pour exprimer ce critère.

$$Biais(\%) = \frac{valeur\ approchée - valeur\ réelle}{|valeur\ réelle|} * 100 \quad [1.3]$$

La précision est la mesure de l'étroitesse d'accord d'une série de mesures prises sur un même échantillon. Elle est typiquement rapportée par un calcul du coefficient de variation.

$$CV(\%) = \frac{écart\ -type\ absolu}{moyenne\ de\ N\ mesures} * 100 \quad [1.4]$$

Ces concepts sont illustrés dans la figure 12.

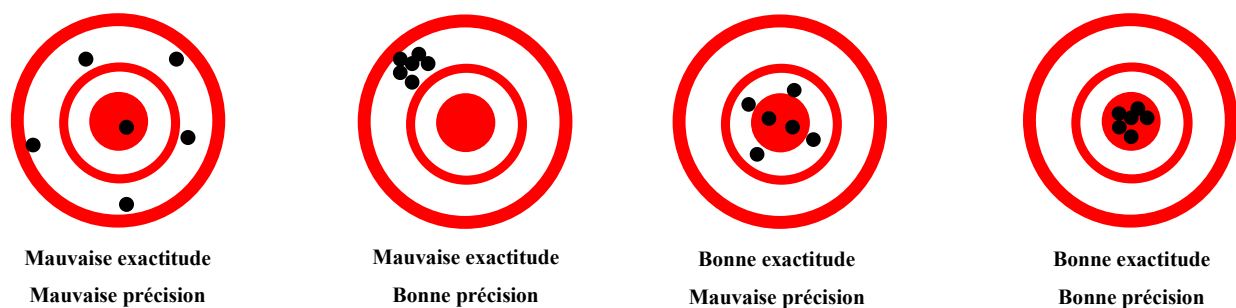


Figure 12. Illustration classique des concepts d'exactitude et de précision

2.3.2. Sélectivité

La sélectivité est la capacité d'une méthode de différencier l'analyte (molécule analysée) des autres constituants de l'échantillon. Autrement dit, la méthode doit pouvoir permettre de faire la distinction entre l'analyte et les autres composés interférents potentiellement présents dans l'échantillon.

2.3.3. Stabilité

La stabilité est le critère évaluant la stabilité chimique d'une espèce dans plusieurs conditions de travail et/ou d'entreposage. Il peut être pertinent d'évaluer la stabilité à 4°C, -20°C ou encore -80°C des extraits et échantillons, mais il est absolument essentiel de fournir au minimum une température pour laquelle ce critère a été évalué.

2.3.4. *Méthodologie utilisée*

La méthodologie appliquée lors de la validation de la méthode analytique présentée dans ce mémoire est explicitée dans la section *Method validation* de l'article inséré au chapitre 2.

CHAPITRE 3. QUANTIFICATION DES ECDYSTEROIDES ET ACIDES RÉTINOÏQUES CHEZ LA PUCE D'EAU

Résumé. : L'article qui suit porte sur la quantification d'ecdystéroïdes et de l'acide rétinoïque chez *Daphnia magna* par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (voir aussi, en annexe I, la procédure d'opération normalisée : *Méthode d'analyse des ecdystéroïdes et rétinoïdes chez Daphnia magna*). Cette méthode constitue la base du projet de recherche sur l'étude métabolomique ciblée de la puce d'eau. Elle permet de quantifier 4 composés suspectés d'être impliqués dans des processus clés à la survie de *D. magna* comme la mue, la reproduction et l'ovulation. Cette méthode permettra de quantifier l'influence de contaminants d'intérêt seuls et de mélanges sur le métabolisme de la puce d'eau. Ainsi, l'évaluation de la fluctuation des niveaux de ces molécules pourrait devenir un nouveau point de terminaison à ajouter aux tests de toxicité actuels et potentiellement permettre la détection d'effets subléthaux aux concentrations environnementales de contaminants d'intérêt émergents présents dans l'environnement et ainsi permettre une meilleure évaluation du risque d'exposition. Malheureusement, cette dernière portion du projet de recherche n'a pu être évaluée puisque le développement de la méthode analytique a été laborieux, et ce, en raison des très faibles concentrations observées des composés ciblés chez la puce (pg par individus).

Contribution de l'auteur: L'article en question a été soumis le 5 novembre 2015 au *Journal of chromatography A* et accepté le 1^{er} février 2016. Il constitue la somme des travaux incluant la recherche de la littérature scientifique, les manipulations en laboratoire, le développement et la validation de la méthode analytique, l'analyse des résultats et enfin la rédaction de l'article qui ont été effectués par l'auteur. Les coauteurs ont agi à titre de conseillers technique et scientifique pour la première soumission de l'article et tout au long de ma maîtrise. Le lecteur est avisé que les références relatives à cet article n'ont pas été intégrées aux références du reste de l'ouvrage.

QUANTIFICATION OF ECDYSTEROIDS AND RETINOIC ACIDS IN WHOLE DAPHNIDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TRIPLE QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY

Philippe Venne¹, Viviane Yargeau², Pedro A. Segura^{1,*}

* Tel: 1-(819) 821-7922. Fax: 1-(819) 821-8019. E-mail: pa.segura@usherbrooke.ca

¹ Department of Chemistry, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1

² Department of Chemical Engineering, McGill University, Montreal, QC H3A 2B2

Keywords: ecdysteroids; retinoic acid; *Daphnia magna*; solid-core columns; tandem mass spectrometry

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.007>

© 2016. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

ABSTRACT

Quantification of ecdysteroids and retinoic acids at picograms per individual is typically achieved with radioimmunoassay methods. However, those methods cannot identify individual types of ecdysteroids or provide an absolute concentration, which poses problems for comparative assays such as the metabolic profiling approach for toxicity testing. The method described in the present paper, based on liquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometry, was developed to allow the quantification in whole daphnids extracts of ecdysteroids (20-hydroxyecdysone, ecdysone, ponasterone A) and retinoic acid (sum of isomers). This approach avoids having to perform the difficult task of sampling the haemolymph on small organism (<5 mm). Recoveries, evaluated at three concentrations in matrix blank fortified samples, ranged from 83 to 119% for ecdysteroids and from 144 to 155% for retinoic acids. Precision (2.4 to 14.2%) and accuracy (-41.7 to 14.5%) were reproducible and stable over three quality controls concentrations. The described liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method achieved quantification limits ranging from 210 to 380 pg mL⁻¹ for ecdysteroids and 5 ng mL⁻¹ for retinoic acids in spiked matrix blanks. 20-hydroxyecdysone was quantified in *D. magna* adults (19 ± 8 pg ind⁻¹) and juveniles (3.6 ± 1.0 pg ind⁻¹), but was below the limit of quantification in neonates (≈ 0.19 pg ind⁻¹). Ecdysone was also detected in adult specimens (≈ 1.8 pg ind⁻¹).

INTRODUCTION

Contaminants of emerging concern such as pharmaceuticals, personal care products, flame retardants and plasticizers are transported into the aquatic environment mainly through municipal sewage. Although removal of these substances occurs in wastewater treatment plants, these facilities were not designed to eliminate those types of contaminants and therefore contaminants of emerging concern are continually released into the aquatic environment [1]. Effects of single contaminants of emerging concern on aquatic species at environmental concentrations ($<100 \text{ ng L}^{-1}$) have been reported for a few compounds such as 17α -ethinylestradiol [2], ibuprofen and ciprofloxacin [3], however anthropogenic introduction of thousands of these compounds at nanogram-per-liter concentrations into surface waters still poses an unknown risk to the aquatic environment.

Current regulatory toxicity assessment of effluents and receiving waters that include endpoints such as mortality, behavioural effects and reproductive dysfunction are limited and are not able to detect differences between a control group and individuals exposed to contaminants of emerging concern at concentrations $<1 \mu\text{g L}^{-1}$ [4]. Thus, more sensitive bioassays are needed to detect subtle changes in aquatic species caused by prolonged exposure to trace amounts of mixtures of these compounds.

A metabolic profiling approach to toxicity testing may bridge this gap between environmental levels of contaminants of emerging concern and bioassay toxicity levels. Among the different organisms suitable for a metabolomic bioassay, the water flea *Daphnia magna* was chosen

because it is already extensively used in laboratories, reproduces very quickly, and is relatively easy to culture. An adult *D. magna*, is able to reproduce every 3-4 days to an average of 6-10 neonates per clutch via cyclical parthenogenesis resulting in a clonal female population [5,6]. Studies have shown that ecdysteroids and terpenoids are potential candidates for a targeted metabolic bioassay since they are suspected to be involved in moulting, reproduction and stress response in *D. magna* and other crustaceans [7-10]. Therefore, they could be potential biomarkers for the detection of subtle toxic effects of contaminants of emerging concern in this organism. Quantification of ecdysteroids at the picogram-per-individual level in small organisms is usually done using radioimmunoassay methods [11,12], which although very sensitive, have several limitations: they cannot distinguish individual types of ecdysteroids, provide semi-quantitative values representing the sum of all cross-reacting substances (often called ‘ecdysteroids equivalent’) and do not account for the ecdysteroids that do not bind to available antisera due to different antisera specificity profile. As a result, data obtained using radioimmunoassay methods cannot be compared [13]. The relatively poor selectivity of radioimmunoassay methods quickly led to the development of selective gas chromatography-mass spectrometry methods using *N*-trimethylsilylimidazole derivatization [14,15]. Those methods required derivatization for 30 min to 60 hours followed by purification by thin-layer chromatography before analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Interestingly, significant structural information can be obtained using those methods by comparing hydroxyl groups’ reactivity; however since ecdysteroid stability during derivatization is unknown such long derivatization step makes routine application difficult and could affect method reproducibility.

More recently, methods focusing on the profiling and characterization of ecdysteroids have used liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with great success. A method using that technique achieved the detection of 20 pg per injection [16]. Further improvement was later done by another group using nano-liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and achieving the detection of 4.81 pg per injection in *Drosophila melanogaster* larvae extracts [17]. A method of characterization and detection of ecdysteroids with liquid chromatography-tandem mass spectrometry using derivatization of ecdysteroids has also been published by Lavrynenko et al. (2013) in *D. melanogaster* with a detection limit of 10 pg per injection [18]. However, quantification methods of ecdysteroids using methods other than radioimmunoassay in small crustacean or insect such as *D.magna* or *Drosophila melanogaster* could not be found in scientific literature.

To the best of our knowledge, quantification of ecdysteroids including a complete validation and determination of the analytical precision and accuracy has been achieved for the *Bombyx mori* (silkworm) only [19] and no study has reported the quantification of retinoic acids in any crustacean or insect. Straightforward application of the method developed for silkworm was not possible due to different sample preparation requirements, the absence of optimization for retinoic acids in addition to ecdysteroids as well as the difference in analytical instruments at our disposal.

Our objective was to achieve detection of three ecdysteroids (20-hydroxyecdysone, ecdysone, ponasterone A) and two retinoic acids (9-cis-retinoic acid and all trans-retinoic acids) (Supplementary material, Fig.S1) at low pictogram levels in whole *D. magna* samples by

optimizing analyte extraction, derivatization, and chromatographic separation. Such a method will allow the monitoring of the concentrations of these key metabolites in *D. magna* in order to study at the molecular level the effect on *D. magna* of exposure to mixtures of contaminants of emerging concern

MATERIAL AND METHODS

3.1. Reagents and chemicals

20-Hydroxyecdysone, ponasterone A, makisterone A, ecdysone, 9-cis retinoic acid (9-cis) and all-trans retinoic acid (all > 95% purity) were obtained from Santa Cruz Biotech (Dallas, TX, USA). Acitretin (> 95% purity) was purchased from Cedarlane (Burlington, Ontario). Makisterone A and acitretin were used as internal standards (ISTD) for ecdysteroids and retinoic acids quantification respectively. Additional purification of makisterone A to remove 20-hydroxyecdysone and ecdysone impurities was necessary and was done using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) separation (Supplementary material, Figure 18). Water, methanol, acetonitrile, methyl tert-butyl ether and liquid-chromatography mass spectrometry mobile phase additives formic acid, ammonium acetate and acetic acid are LC or LC-MS grade and were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The derivatization reagent hydroxylamine hydrochloride ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) was purchased from Sigma Aldrich (ReagentPlus, purity > 99%). Frozen daphnids (Hikari Bio-Pure, Hayward, CA, USA), used as a matrix blank to prepare quality control samples, were purchased from a local aquarium store (Aquatica, Montreal, QC, Canada). Stock solutions were prepared at 0.1 mg mL^{-1} in methanol and stored at -20°C . Working solutions were prepared in 1 % formic acid in methanol and stored

at -20°C. A new aqueous solution of the derivatization agent was prepared fresh before each experiment.

3.2. Culture of *Daphnia magna*

Daphnids are cultured and maintained in ISO Standard Freshwater [20] at 25°C under a 16 h: 8 h light: dark photoperiod. Cultures are maintained at a density of 40 organisms per liter of culture medium. Culture medium is renewed once a week and daphnids are feed daily using a concentrated algal suspension of *P. subcapitata*. Daily rations were calculated to obtain 0.1-0.2 mg of organic carbon per daphnid per day using a nomograph plotting optical density versus total organic carbon in accordance with OECD 211 [21]. Algal cultures were grown in Bold's modified medium.

3.3. Sample preparation

3.3.1. *Extraction and derivatization*

Water fleas (*D.magna*) are sorted by size by filtering through a series of sieves (300µm, 560µm, 900µm). Adults are collected on the 900 µm sieve, juveniles on the 560 µm sieve and neonates on the bottom sieve (300 µm). Between 25 (adults) and 100 (juveniles and neonates) *D. magna* individuals are collected on a 250 µm tissue strainer (Pierce, Thermo Scientific), washed with deionized 18MΩ H₂O and sonicated in an ultrasonic bath (VWR symphony, model 97043-964) for 15 min in a volume of 1 mL 1% formic acid in methanol inside a 50 mL Falcon tube (Corning Life Sciences). Then, an 800 µL aliquot is evaporated to dryness under a N_{2(g)} flow. Derivatization of ecdysteroids is done at 70°C for 90 min using 1 mL of a 100 mg mL⁻¹ hydroxylamine hydrochloride aqueous solution. Analytes are then extracted from the aqueous

phase using 2×1.5 mL of methyl tert-butyl ether. The organic phase is transferred in another glass tube, evaporated to dryness and reconstituted in 150 μ L of methanol.

3.3.2. *Quantitative analysis by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*

UPLC was performed on an Acquity system from Waters Corp. using a solid-core particle column. Experimental conditions of the chromatographic method are summarized in Table 8.

Tableau 8 UPLC method parameters for the quantification of ecdysteroids and retinoic acids.

Parameter	UPLC
Column	Acquity UPLC Cortecs (C_{18}^+), 2.1×50 mm, 1.6 μ m
Flow rate	0.5 mL min ⁻¹
Column temperature	30 °C
Mobile phases	A: 0.1 % acetic acid in H ₂ O B: 0.1 % acetic acid in methanol: acetonitrile (3:2)
Gradient	0-7.9 min : 5-55% B 7.9-8 min : 55-65% B 8-13 min : 65-72% B 13-20 min : 72-100% B 20-22 min : 100% B 22-30 min : 5% B
Wash solvents	Strong: Methanol Weak: 0.1% acetic acid in H ₂ O
Injection volume	10 μ L in partial loop mode
Injection loop volume	20 μ L
Autosampler temperature	20 °C

The UPLC system was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Quattro Premier, Waters Inc.) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The ESI source was operated in the positive mode from 0 to 10 min and in the negative mode from 10 to 30 min. Data acquisition was performed in the selective reaction monitoring (SRM) mode. The method developed used electrospray ionization instead of atmospheric pressure chemical ionization as it is more commonly used in laboratories. Mass spectrometry parameters are summarized in Table 9.

Tableau 9. ESI source and mass spectrometer parameters for the quantification of ecdysteroids and retinoic acids using the SRM mode.

Parameter	Mak A				Acitretin	
	20E	E	Pon A	(ISTD)	RA	(ISTD)
Retention time (min)	4.9	5.9	7.6	5.6	14.0-15.1	11.6-13.0
Ionization mode	ESI +	ESI +	ESI +	ESI +	ESI -	ESI -
Capillary voltage (kV)	2.5	2.5	2.5	2.5	3.0	3.0
Cone voltage (V)	50	50	50	50	35	35
Source temperature (°C)	120	120	120	120	120	120
Desolvation temp. (°C)	450	450	450	450	450	450
Cone gas flow (L/Hr)	50	50	50	50	50	50
Desolvation gas flow (L/Hr)	700	700	700	700	700	700
Collision pressure (mbar)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Dwell time (s)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Collision energy (eV)	30	20	30	30	15	15
Precursor ion (<i>m/z</i>)	478.4	462.4	462.4	492.4	299.3	325.2
Product ion (<i>m/z</i>)	316.3	444.4	316.3	316.3	255.3	265.9
Smoothing iteration	2	2	2	2	2	2
Smoothing width	2	2	2	2	2	2

20E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A; Mak A: makisterone A; RA: retinoic acids.

Data processing was done using built-in software QuanLynx. Smoothing was done using the mean smoothing method. Quantification of analytes was done using calibration curves obtained by least squares linear regression of the ratio of the area of the analyte and the internal standard as a function of analyte concentration; no weighting function was used. Peak areas of retinoic acids and acitretin isomers were summed. Calibration was done using pure solution standards.

3.4. Method validation

3.4.1. *Matrix effects, and recovery*

Matrix effects were evaluated using two different techniques : postextraction addition and postcolumn infusion as described by Taylor [22]. Briefly, postextraction addition consists in spiking the analytes to pure solvent solutions and to extracted matrix blanks and measuring the resulting signals. The ratio between the mean peak area of the postextraction addition samples and the mean peak area of a pure solution give us the matrix effects. Extracts of frozen daphnids were used as matrix blank quality control (QC) samples and were fortified at 285, 475, 713 pg mL⁻¹ for 20E, at 318, 530, 795 pg mL⁻¹ for E, at 411, 685, 1028 pg mL⁻¹ for PonA, and at 7.7, 12.8, 19.2 ng mL⁻¹ for retinoic acids in order to evaluate matrix effects at low (QC_{LOW}), medium (QC_{MED}) and high (QC_{HIGH}) levels. Determination of matrix effects by postcolumn infusion consists in injecting a non-fortified matrix blank and adding to the column effluent a solution containing the analytes using a tee connector and a syringe pump. This technique thus allows us to determine the presence of matrix effects during the whole chromatographic run. Recovery was calculated as the ratio between preaddition extraction and the mean peak area of the postextraction addition solution.

3.4.2. *Accuracy, precision, lower limit of quantification and limit of detection*

Accuracy and precision (intra and interday) were calculated using the QC samples described previously. Accuracy is expressed as the mean relative error (bias) and precision as the coefficient of variation (CV%) of 5 injections done the same day (intraday) or 5 injections done

in 5 different days (interday). Acceptable lower limit of quantification (LLOQ) is defined according to U.S. Food and Drug Administration (FDA) guidelines [23] as the lowest analyte concentration giving an accuracy within $\pm 20\%$ (bias), inter-assay precision (CV%) $\leq 20\%$ and minimum signal-to-noise ratio (S/N) > 8 . The limit of detection (LOD) is determined as the concentration achieving a minimum S/N > 3 .

3.4.3. *Stability*

Short-term stability of analytes at -20°C in methanolic extracts was evaluated with matrix fortified frozen daphnids using the QCs described previously. Each experiment was performed in duplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

3.5. Optimization of sample preparation

Initial sensitivity and LLOQ assessment of the triple quadrupole mass analyzer (Quattro Premier, Waters Corp.) for the targeted compounds proved insufficient (Figure 19, Supplementary material) for the quantification of the low level of ecdysteroids in *D.magna*. Consequently, derivatization was needed to improve sensitivity. Several derivatization agents were evaluated and our selection processes was guided by three criteria: 1) the derivatization agent is able to react with the majority of known ecdysteroids; 2) the derivatization reaction should not add bulky groups to the molecular structure of the ecdysteroids that could shift retention times considerably, given that chromatographic separation of ecdysteroids had already been achieved

successfully; and 3) the derivatization reaction should not cause the elimination of possible conjugated forms [24]. Taking into consideration criterion #1 we aimed for the derivatization of the 6-keto group, the most conserved group among ecdysteroids [25], to enhance ionization. Among the derivatization agents used for ketone derivatization we selected hydroxylamine, which yields a ketoxime. Other sterol ketone derivatization agents used for mass spectrometry detection [26] such as 1-(carboxymethyl)pyridinium chloride hydrazide (Girard P) , 1-(carboxymethyl)trimethylammonium chloride hydrazide (Girard T), 2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP) or 2-hydrazinopyridine (HP), were eliminated due to one or more unmet criteria.

Experiments showed that optimal pH and reaction time for the derivatization of ecdysteroids with hydroxylamine were different than those normally used for mammalian 3-keto sterols [27]. Derivatization reaction (Supplementary material, Figure 20) was ultimately successful at lower pH (a pH of 2.7 was used instead of 10), lower temperatures (70°C instead of 90°C) and longer derivatization time (90 min instead of 30 min) (Fig. 1). As expected, chromatographic separation was maintained (Supplementary material, Figure 21) and it was achieved faster than for Girard P or Girard T derivatized ecdysteroids [18].

Elimination of a water molecule was observed for all the derivatized ecdysteroids. We suspect that this is not an ion-source fragment but rather an elimination in solution due to the acidic conditions used. Reaction yield was also evaluated to be >97% by quantifying remaining underivatized ecdysteroids form in a fortified matrix blank (Figure 22, Supplementary Information). Confirmation of the proposed structure of the ecdysteroid 6-ketoximes was not

performed due to the limited amount of ecdysteroids available. However, previously published specific loss of the 14-hydroxyl group yielding a double bond between C14 and C15 is the most probable explanation for this water loss [18,28].

Retinoic acids isomerization occurs upon exposure to ambient light and can be delayed by using amber glass vials. However, this additional step was not taken for method validation as retinoic acids were never detected in daphnids. As a result, the sum of the different isomers of retinoic acids areas was used for quantitative analysis.

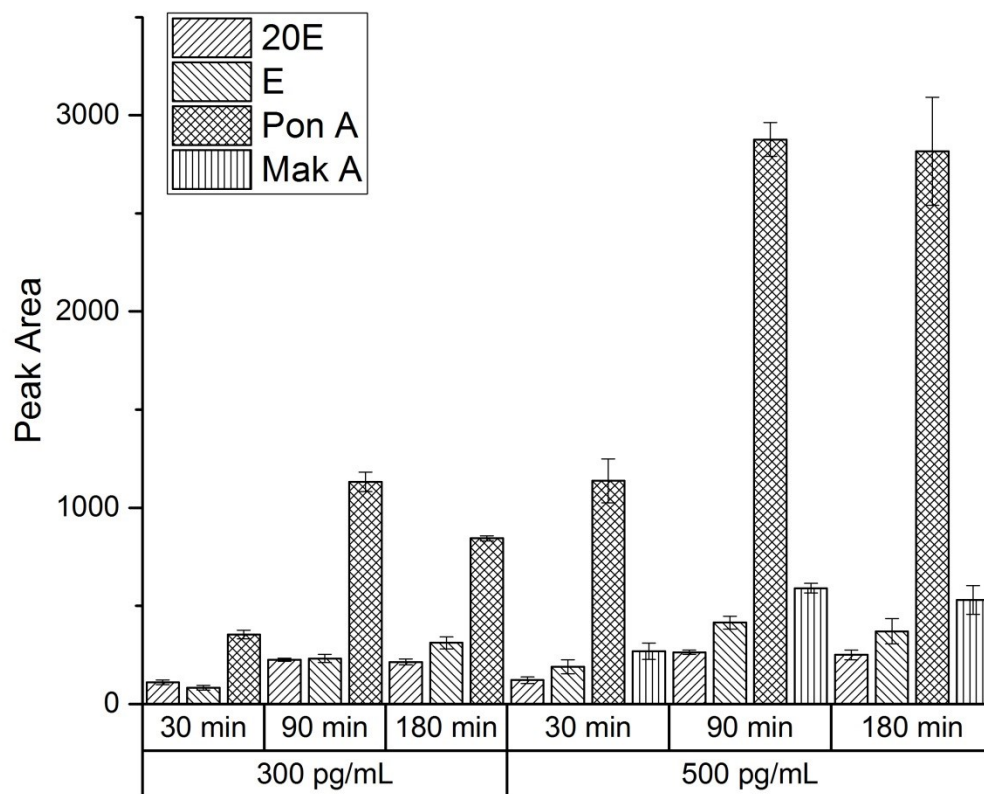


Figure 13 Derivatization of 300 pg and 500 pg mL⁻¹ of 6-keto ecdysteroids (20E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A; Mak A: makisterone A) in frozen daphnids matrix using hydroxylamine hydrochloride 100 mg mL⁻¹. Total length of error bars represents two standard deviations of 5 replicates.

3.6. Optimization of liquid chromatography

Adequate chromatographic resolution of the target analytes can be achieved with classic porous C₁₈ UPLC columns; however liquid chromatography optimization experiments showed that UPLC columns containing solid-core particles were able to achieve better chromatographic

resolution for target retinoic acids (Fig. 14). Different combination of solvents (acetonitrile, methanol, isopropanol, H₂O) and additives (formic acid, acetic acid) were tested in order to achieve optimal separation and signal intensity for target analytes. As shown in Fig. 3, optimal mobile phase additive is 0.1% acetic acid. We observed that this mobile phase additive achieves the highest signal and signal-to-noise ratio for all analytes, compared to the other conditions tested, when coupled with polarity switch and hydroxylamine derivatization. This figure also shows the most abundant ion detected for each mobile phase additives tested in both negative and positive mode. Interestingly, underivatized ecdysteroids form negatively charged acetate adducts when acetic acid and ammonium acetate is used. In some cases, these acetate adducts achieve higher signal intensities than the protonated molecule $[M+H]^+$ and the formate adducts.

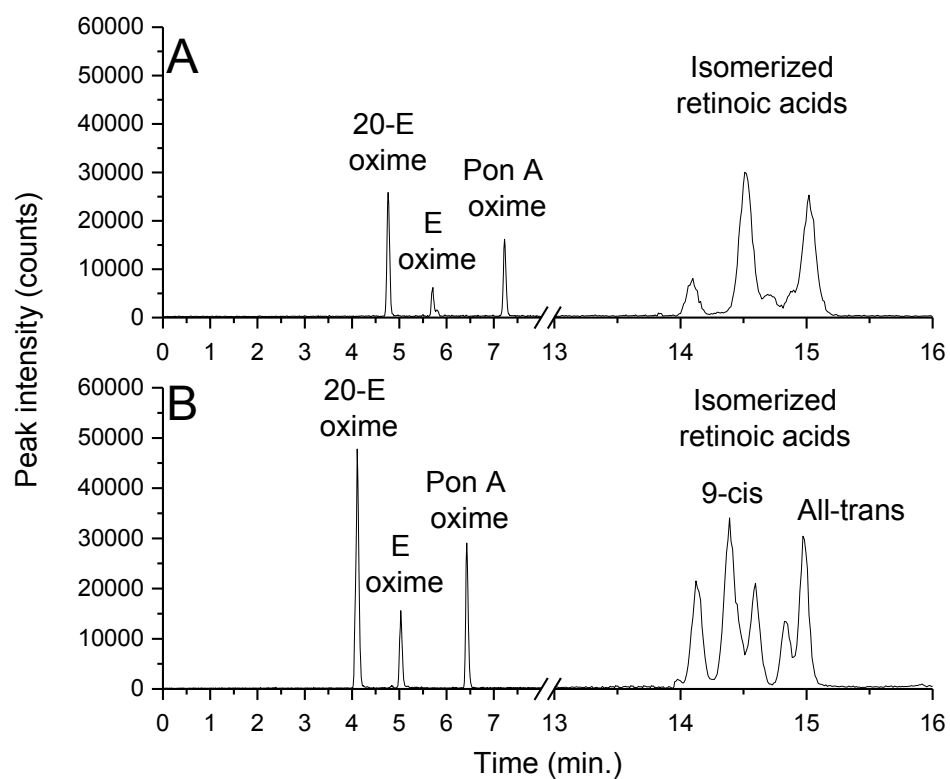


Figure 14 Chromatographic comparison between porous C₁₈ column (A) and solid-core C₁₈ column (B) using identical chromatographic gradient. 20-E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A.

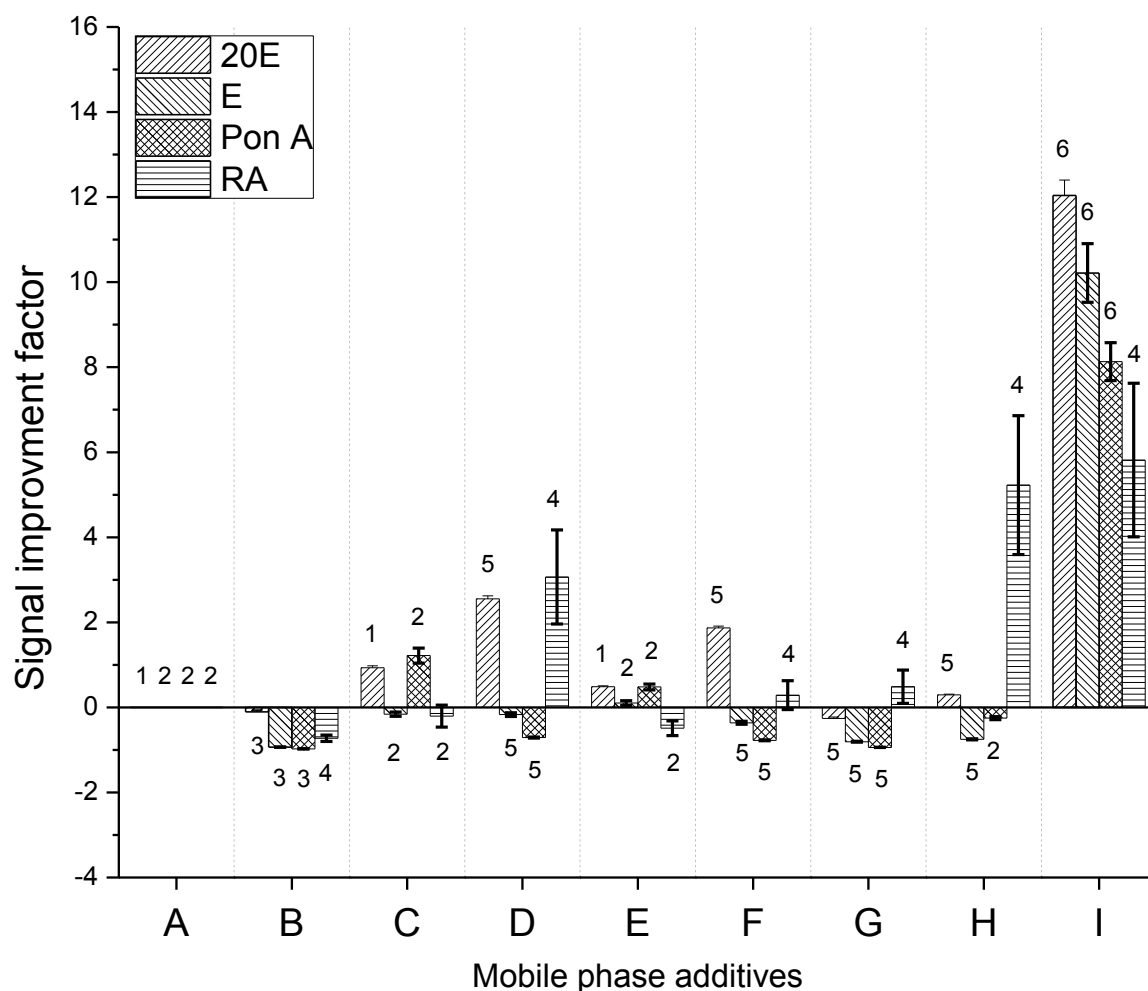


Figure 15 Optimization of mobile phase additives and ionization conditions.

A: ESI + 0.1% formic acid; B: ESI - 0.1% formic acid; C: ESI+ 0.1% acetic acid; D: ESI - 0.1% acetic acid; E: ESI + 0.5% acetic acid; F: ESI - 0.5% acetic acid; G: ESI - 5 mM ammonium acetate; H: ESI +/- 0.1% acetic acid polarity switch; I: ESI +/- 0.1% acetic acid polarity switch and derivatization. Bar labels identifies the most abundant adducts: 1: $[M-2H_2O]^+$ 2: $[M+H]^+$ 3: $[M+HCOO]^-$ 4: $[M-H]^-$ 5: $[M+CH_3COO]^-$ 6: $[M+NOH-H_2O]^+$. Total length of error bars represents two standard deviations of 3 replicates. 20-E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A; RA: retinoic acids.

3.7. Method validation

3.7.1. *Matrix effects, recovery and stability.*

Matrix effects were assessed using two methods appropriate for liquid chromatography-mass spectrometry methods: postcolumn infusion and postextraction addition. Postcolumn infusion method was used as a qualitative determination of matrix effects over the entire chromatographic run during method development. As shown in the chromatograms presented in Supplementary material (Figure 23), signal suppression for the chosen mobile phases (0.1% acetic acid) is low or the first 10 min of the chromatographic run; and increases significantly after. However, further improvements to reduce ionization suppression of retinoic acids could not be achieved without modifications to sample preparation and or chromatographic modification resulting in ecdysteroids and retinoic acids loss and/or ionization reduction. Quantitative measurement of matrix effects using the post addition method, reported in Table 3, shows that low (<11%) signal enhancement was observed for 20E and slight signal suppression was observed for E (>-10.1%). However significant ME are observed for Pon A (-17.2 to -13.1%) and RA (-68.1 to -66.1%). In order to obtain the true value of ponasterone A and retinoic acids, the detected concentration can be corrected using accuracy bias corresponding to the closest QC samples. The accuracy bias can be used for that purpose since it quantifies the effect of matrix effects and sample preparation on the signal of the analyte. For example, if ponasterone A is detected in samples at 500 pg mL⁻¹, a correction factor of -30.5% (interday accuracy bias for ponasterone A) would be applied, giving a true concentration of 719 pg mL⁻¹. Surprisingly, ponasterone A signal suppression was higher than what was evaluated with post column infusion method (-10%). Although very useful for

method development, post column infusion is not a substitute to post addition method when determining matrix effects.

Relative recovery for targeted analytes ranged from 83 to 155 %. Higher recoveries for retinoic acids cannot be fully explained but met FDA validation criteria since they remained consistent, precise, and reproducible over three QC concentrations [23]. Short term stability of methanolic extracts was evaluated at -20 °C, results are presented in Table 12. Daphnids methanolic extracts were stable for 24h; extracts kept for more than 24h at -20°C resulted in higher bias for 20-hydroxyecdysone and ponasterone A.

3.7.2. Accuracy and precision and lower limit of quantification (LLOQ)

Accuracy and precision were evaluated using fortified matrix blanks samples and reported in Table 10. Analytical precision of all QCs (2.4 to 14.2%) were below acceptable limits (<15%) according to FDA. Accuracy for 20-hydroxyecdysone and ecdysone met FDA validation criteria. However, a negative bias was observed for ponasterone A and retinoic acids and this bias is attributed to higher matrix effect for these analytes. The negative bias between pure solution standard and quality control prepared using frozen daphnids matrix blank was reproducible and can be easily corrected mathematically to obtain actual ponasterone A and retinoic acids levels in daphnids. As matrix blank QC samples may not be readily available for other species, the use of pure solution standards as calibrants was preferred in order for the method to be potentially applied to other similar small crustaceans and arthropods with minimal partial validation.

Results for the determination of LOD and LLOQ are shown in Table 11. LOD between 0.04 and 0.22 pg per injection for ecdysteroids and 10 pg per injection for retinoic acids achieved with the present method are lower than previously published methods using LC-MS [17]. LLOQ is similar to what is obtained with radioimmunoassay methods, which typical range is between 100 to 3500 pg [13]. However, method specificity is greatly improved as identification of individual type of ecdysteroid is now possible using both retention time and MS detection. More importantly, results are no longer dependent on the antisera used and correction using cross-reaction factors is not needed. Therefore, data obtained with the liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method developed can be more easily compared.

Tableau 10 Matrix effects, relative recovery, intra- and interday accuracy and precision for low, medium and high QC samples.

Compound	Postextraction addition (<i>n</i> = 6)		Intraday (<i>n</i> = 5)		Interday (<i>n</i> = 5)	
			QC _{LOW} ; QC _{MED} ; QC _{HIGH}			
	Matrix effects %	Relative recovery %	Precision CV%	Accuracy Bias%	Precision CV%	Accuracy Bias%
20-hydroxyecdysone	11.0; 3.7; 2.6	92; 104; 104	6.2; 6.2; 10.5	14.5; 6.2; 10.8	8.7; 8.9; 2.0	11.7; 10.8; 8.7
Ecdysone	-0.3; -7.8; -10.1	119; 106; 108	3.7; 3.5; 2.4	3.8; -4.4; 1.3	8.5; 4.4; 6.0	5.5; -2.0; -4.4
Ponasterone A	-17.2; -19.3; -13.1	83; 90; 86	14.2; 12.5; 14.1	-27.4; -30.5; -24.8	12.8; 9.2; 13.7	-27.6; -26.7; -27.5
Retinoic acids	-66.1; -67.0; -68.1	144; 155; 153	10.8; 10.3; 10.3	-36.5; -41.7; -37.3	11.7; 9.4; 12.5	-41.1; -40.2; -38.8

Tableau 11 Linearity of calibration curves, limits of quantification and detection for ecdysteroids and retinoic acids.

Compound	LLOQ	LOD		<i>R</i> ²	Calibration range
	pg mL ⁻¹	pg mL ⁻¹	pg per injection		pg mL ⁻¹
20-hydroxyecdysone	230	15	0.15	0.992	230 - 1140
Ecdysone	210	22	0.22	0.997	210 - 1270
Ponasterone A	380	4	0.04	0.991	380 - 1640
Retinoic acids	5000	1000	10	0.999	5000 - 31000

Tableau 12 Stability, quantified as bias percentage at -20°C for low, medium and high QC samples.

Compound	Bias (%)			
	QC _{LOW} ; QC _{MED} ; QC _{HIGH}			
	24 h	48h	72h	96h
20-hydroxyecdysone	11.8; 3.1; 3.4	25.7; 9.5; 15.0	4.7; 12.6; 17.5	13.1; 0.1; 2.7
Ecdysone	-2.3; 4.2; 7.5	7.5; -5.8; -4.1	5.5; 0.4; -1.3	2.3; -2.1; -3.2
Ponasterone A	-30.3; -26.5; -22.3	-22.3; -30.6; -31.9	-29.3; -37.0; -38.3	-14.1; -16.7; -13.8
Retinoic acids	-46.0; -39.1; -34.9	-32.3; -41.8; -35.5	-42.7; -47.3; -46.6	-38.8; -40.2; -37.8

3.7.3. Analysis of ecdysteroids and retinoic acids in *D. magna* cultures

The developed method was applied to the analysis of 20-hydroxyecdysone, ecdysone, ponasterone A and retinoic acids in laboratory-cultured daphnids. Reported concentrations are presented in Table 13. Detection of 20-hydroxyecdysone in *D. magna* neonates, juveniles and adults was achieved (representative chromatograms are presented in Fig. 4). While detection of 20-hydroxyecdysone was possible at all development stages of *D. magna*, quantification was only possible in specimens larger than 560 µm (juveniles and adults). These results are of the same order of magnitude than previous studies on the presence of ecdysteroids in adult daphnids [10], which reported ecdysteroids equivalents between 5 to 10 pg per individual to 250 pg per individual using radioimmunoassay. Neither makisterone A (internal standard), ponasterone A or retinoic acids were detected in daphnids extracts.

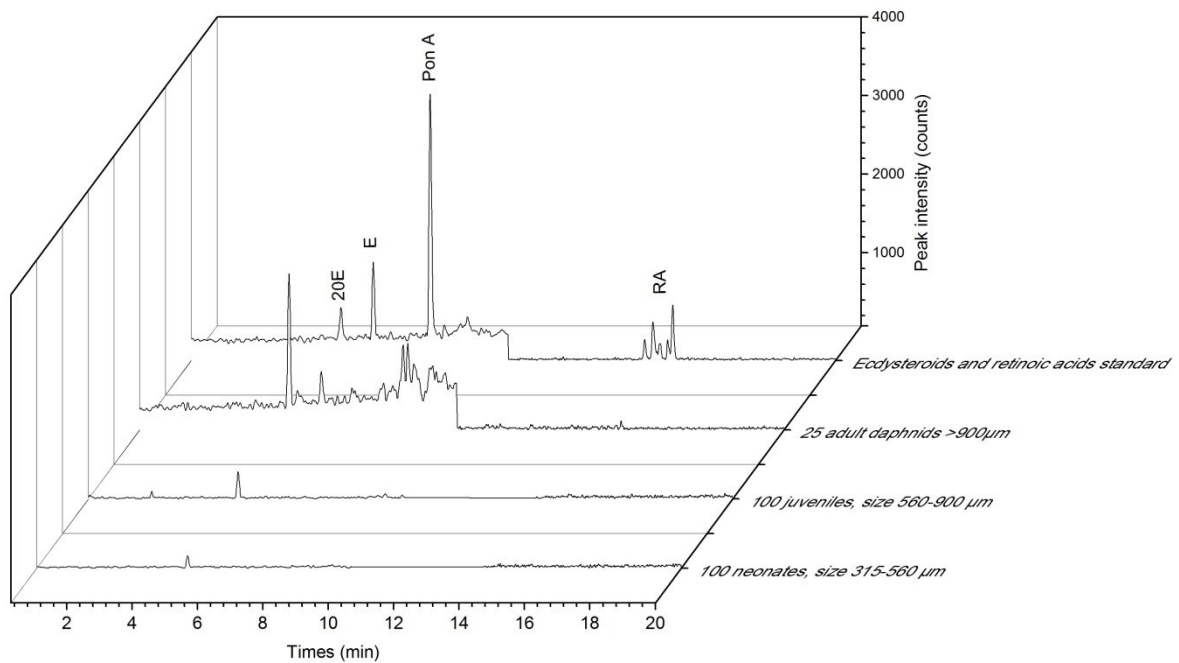


Figure 16 Representative chromatograms of ecdysteroids (20-E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A) and retinoic acids (RA) levels in *D. magna*

Tableau 13 Laboratory-cultured ecdysteroids and retinoic acids levels in *D. magna*. Concentrations are reported in pg per individual. Concentrations are reported in pg per individual.

Compound	Laboratory-cultured daphnids extraction		
	(n = 3)		
	100 neonates, size 315-560 µm	100 juveniles , size 560-900 µm	25 adults, size >900µm
	pg ind ⁻¹	pg ind ⁻¹	pg ind ⁻¹
20E	(0.19)	3.6 ± 1.0	19 ± 8
E	< LOD	< LOD	(1.8)
Pon A	< LOD	< LOD	< LOD
RA	< LOD	< LOD	< LOD

Concentrations reported in parentheses are higher than LOD but below LOQ.

CONCLUSION

Sample preparation and chromatographic separation were optimized to allow quantification of picogram per individual levels of ecdysteroids and retinoic acids in *D. magna* using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Such method is particularly useful in small organisms where hemolymph extraction is difficult. The method presented fulfilled standard analytical validation criteria in terms of precision ($<15\%$), accuracy ($<\pm 15\%$), for 20-hydroxyecdysone and ecdysone. Although the negative accuracy observed for ponasterone A and retinoic acids is higher than FDA acceptance criteria, this negative bias was reproducible, stable over three QCs concentrations and can be explained by matrix effects. To the best of the authors' knowledge these are the first results reported on the use of a quantitative approach for the analysis of complex small organisms without hemolymph sampling. The applicability of the method was demonstrated by analysis of *D. magna* extracts in adults, juvenile and neonate daphnids. 20-hydroxyecdysone could be quantified in both adults and juveniles but was below LLOQ in neonates; ecdysone was only detectable in adult specimens. Further work is required to focus on the evaluation of daphnids ecdysteroids levels in toxicity response upon exposure to environmental concentrations of mixtures of contaminants of emerging concern.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through Discovery grants awarded to V. Yargeau and P.A. Segura. We would like to thank René Gagnon for his technical help with analytical instrumentation. Funding sources did not have any involvement in the design, experiments, data interpretation, writing, revision or submission of this study.

REFERENCES

- [1] A. Pal, K.Y.-H. Gin, A.Y.-C. Lin, M. Reinhard, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 6062.
- [2] K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, R.W. Flick, *P Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 8897.
- [3] H. De Lange, W. Noordoven, A. Murk, M. Lüring, E. Peeters, *Aquat. Toxicol.* 78 (2006) 209.
- [4] C.M. Flaherty, S.I. Dodson, *Chemosphere* 61 (2005) 200.
- [5] U.S. Environmental Protection Agency, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms* Washington, DC, 2002.
- [6] D. Ebert, *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*, National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, 2005.
- [7] R. LaFont, *Ecotoxicol.* 9 (2000) 41.
- [8] G.A. LeBlanc, *Ecotoxicol.* 16 (2007) 61.
- [9] G.P.C. Nagaraju, *Aquaculture* 272 (2007) 39.
- [10] D. Martin-Creuzburg, S.A. Westerlund, K.H. Hoffmann, *Gen. Comp. Endocr.* 151 (2007) 66.
- [11] E.S. Chang, J.D. O'Connor, in B. Jaffe (Editor), *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, Academic Press, New York, NY, 1978, p. 797.
- [12] J.T. Warren, L.I. Gilbert, in L. Gilbert, T. Miller (Editors), *Immunological Techniques in Insect Biology*, Springer, New York, NY, 1988, p. 181.
- [13] L. Reum, J. Koolman, in J. Koolman (Editor), *Ecdysone: From Chemistry to Mode of Action*, Thieme Medical Publishers, Stuttgart, Germany, 1989, p. 131.
- [14] C. Bielby, E. Morgan, I. Wilson, *J. Chromatogr. A* 351 (1986) 57.
- [15] R.P. Evershed, J.G. Mercer, H.H. Rees, *J. Chromatogr. A* 390 (1987) 357.
- [16] Y. Li, J.T. Warren, G. Boysen, L.I. Gilbert, A. Gold, R. Sangaiah, L.M. Ball, J.A. Swenberg, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 185.
- [17] C. Blais, T. Blasco, A. Maria, C. Dauphin-Villemant, R. Lafont, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 925.
- [18] O. Lavrynenko, R. Nediakov, H.M. Möller, A. Shevchenko, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2265.
- [19] J. Hikiba, M.H. Ogihara, M. Iga, K. Saito, Y. Fujimoto, M. Suzuki, H. Kataoka, *J. Chromatogr. B* 915 (2013) 52.
- [20] Organisation for Economic Co-Operation and Development, Test No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*, available at [10.1787/9789264069947-en], retrieved on 2015-10-23.
- [21] Organisation for Economic Co-Operation and Development, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*, available at [DOI: 10.1787/20745761], retrieved on 2015-10-23.
- [22] P.J. Taylor, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328.

- [23] U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, [<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/default.htm>], 2001.
- [24] R. LaFont, C. Blais, J. Harmatha, I.D. Wilson, in I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole (Editors), Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, London, UK, 2000, p. 2631.
- [25] R. LaFont, J. Harmatha, F. Marion-Poll, L. Dinan, I.D. Wilson, in, 2002.
- [26] T. Santa, Biomed. Chromatogr. 25 (2011) 1.
- [27] M.M. Kushnir, A.L. Rockwood, W.L. Roberts, E.G. Pattison, W.E. Owen, A.M. Bunker, A.W. Meikle, Clinical chemistry 52 (2006) 1559.
- [28] I. Galyautdinov, N. Ves'kina, S. Afon'kina, L. Khalilov, V. Odinokov, Russ. J. Org. Chem. 42 (2006) 1333.

QUANTIFICATION OF ECDYSTEROIDS AND RETINOIC ACIDS IN WHOLE DAPHNIDS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TRIPLE QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY

Philippe Venne¹, Viviane Yargeau², Pedro A. Segura^{1,*}

* Tel: 1-(819) 821-7922. Fax: 1-(819) 821-8019. E-mail: pa.segura@usherbrooke.ca

¹ Department of Chemistry, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1

² Department of Chemical Engineering, McGill University, Montreal, QC H3A 2B2

SUPPLEMENTARY MATERIAL

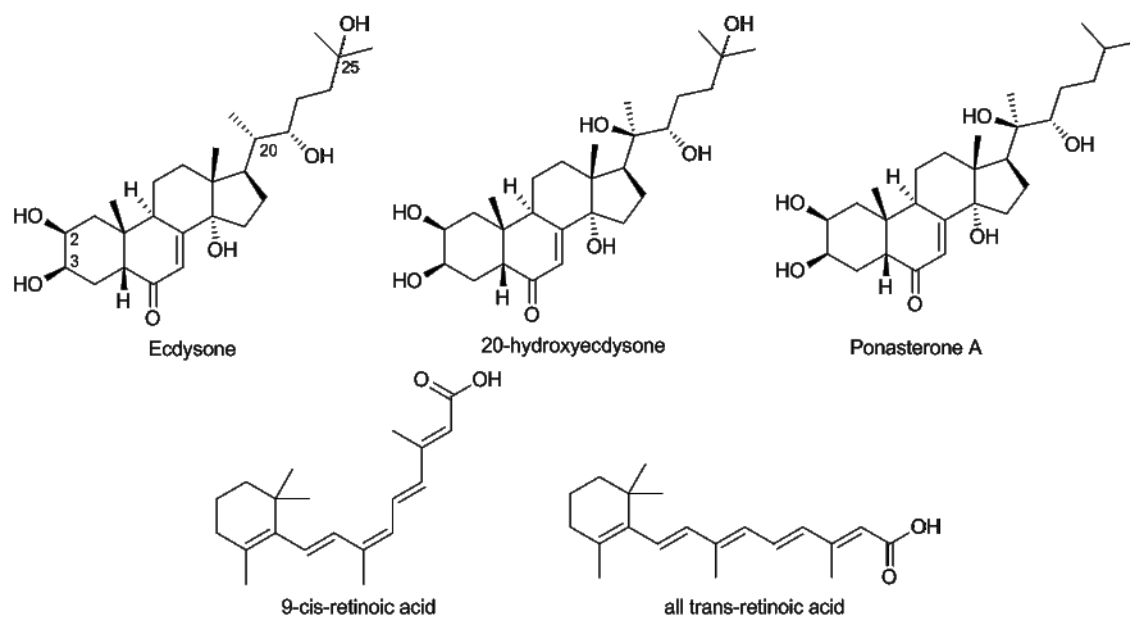


Figure 17 Targeted ecdysteroids and retinoic acids.

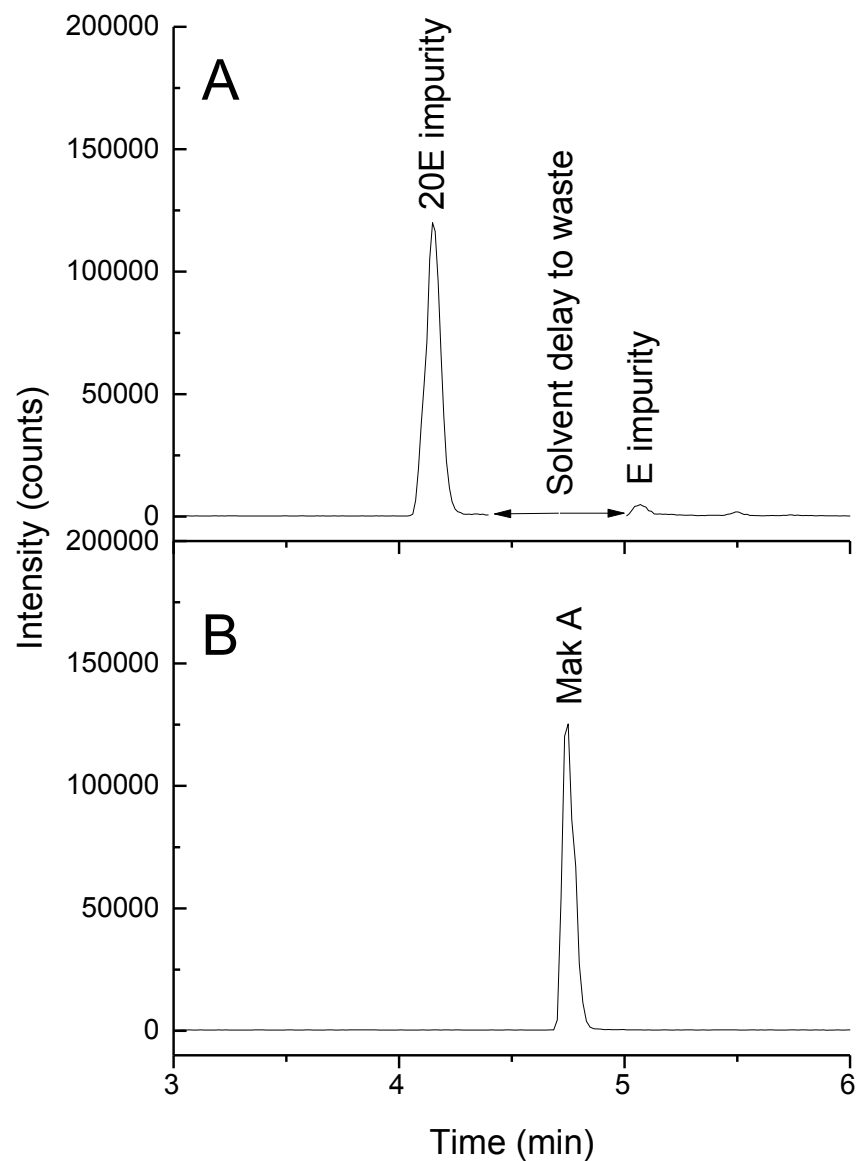
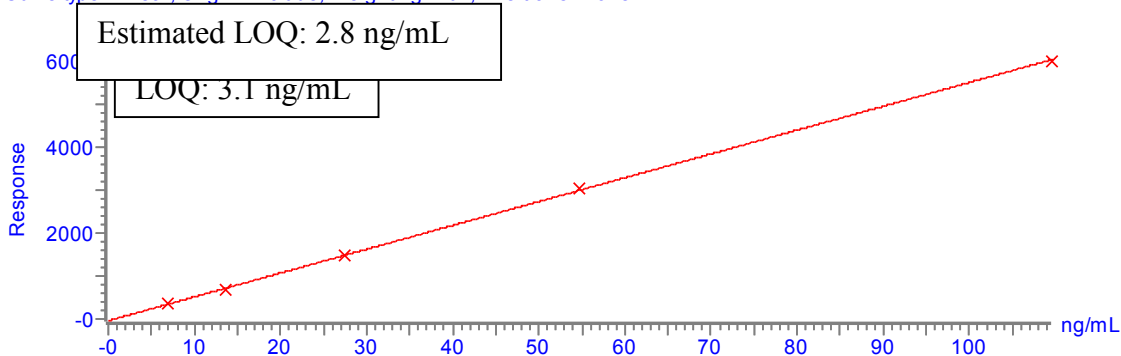


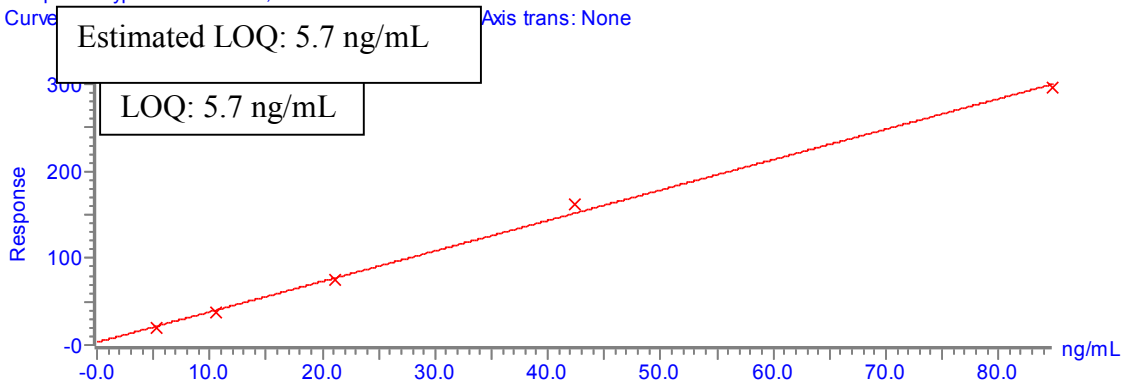
Figure 18 Additional purification of makisterone A (Mak A).

Purification was achieved by turning the instrument divert valve to waste during the retention time window of Mak A and collecting in a vial the eluate (15 injections). **A:** Pure solution Mak A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ standard, solvent delay from 4.4 to 5.0 min., **B:** Pooled injections of purified Mak A.

Compound name: Ponasterone A
 Correlation coefficient: $r = 0.999877$, $r^2 = 0.999753$
 Calibration curve: $55.2603 \cdot x + -23.0149$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Ecdysone
 Correlation coefficient: $r = 0.998782$, $r^2 = 0.997566$
 Calibration curve: $3.50372 \cdot x + 3.20104$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: 20-Hydroxycdysone
 Correlation coefficient: $r = 0.999561$, $r^2 = 0.999123$
 Calibration curve: $21.6026 \cdot x + 2.62623$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

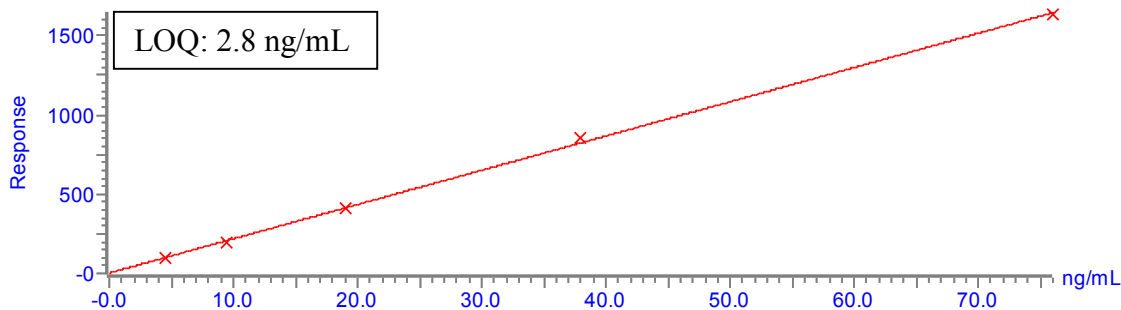


Figure 19 Initial sensitivity assessment of the Quattro Premier using 0.1% AA as solvent A and ESI +/- polarity switch.

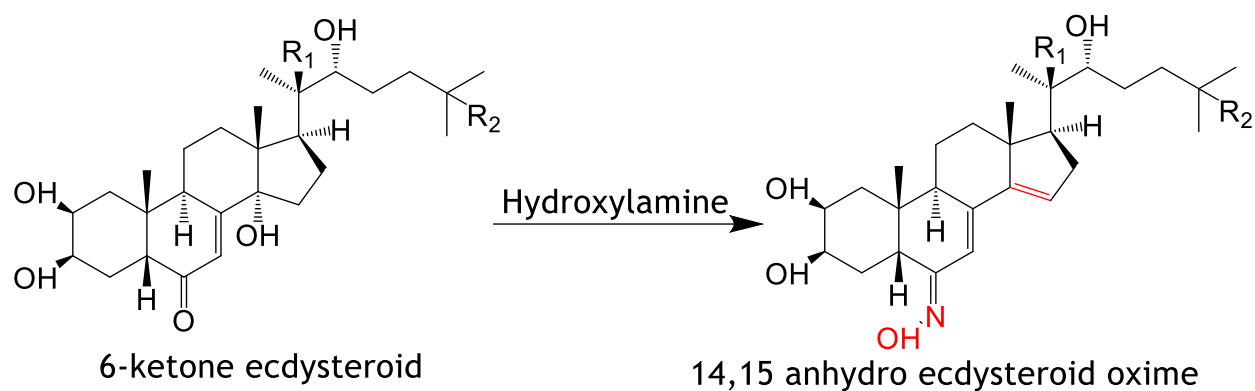


Figure 20 Derivatization of ecdysteroids by hydroxylamine hydrochloride in acidic conditions (pH = 2.7).

Ecdysteroids: 20-hydroxyecdysone: $R_1 = R_2 = \text{OH}$; Ecdysone: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, Ponasterone A: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$.

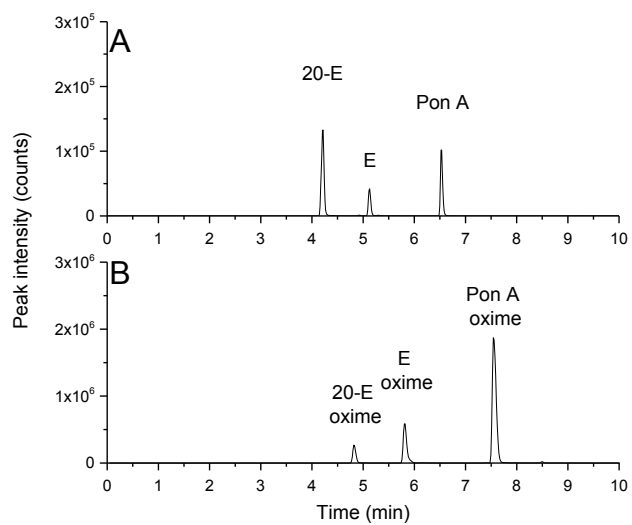


Figure 21 Comparison between chromatographic separations of derivatized ecdysteroids (A) and underivatized form (B) using identical chromatographic gradients.

20-E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone; Pon A: ponasterone A.

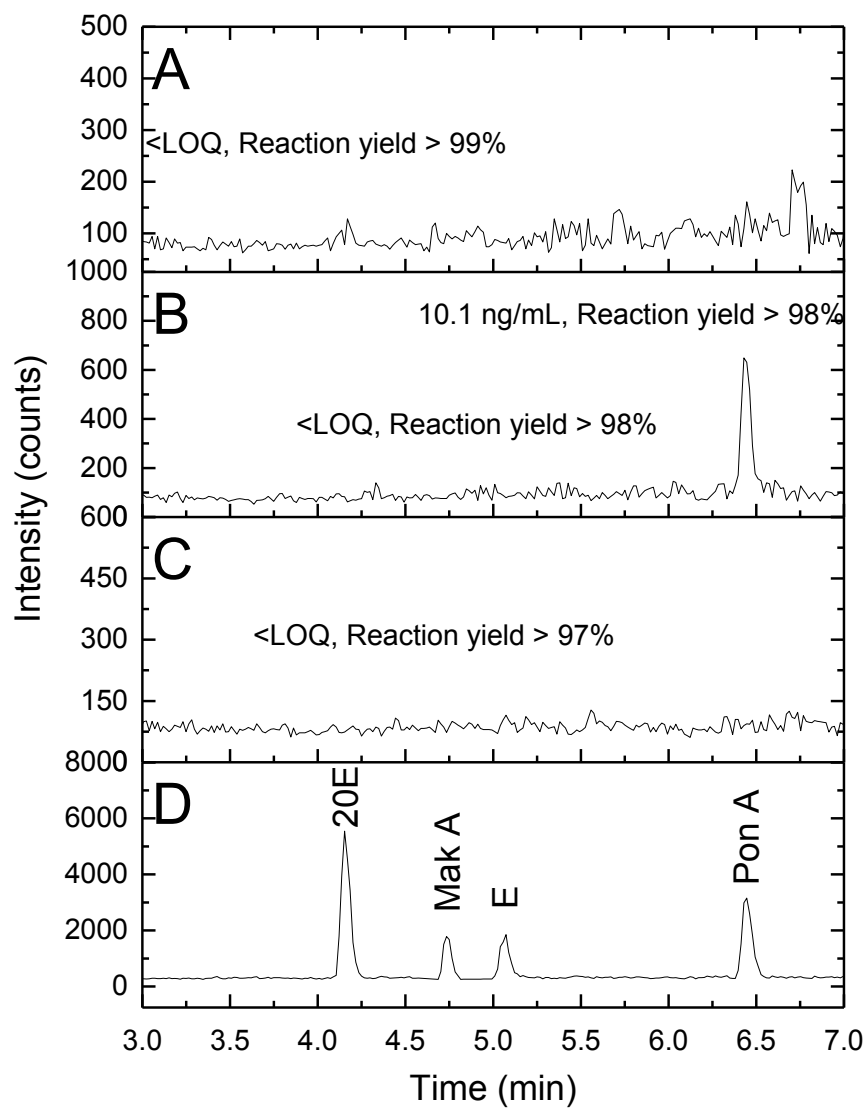


Figure 22 Quantification of remaining underivatized ecdysteroids in a fortified matrix blank at (A) 20-hydroxyecdysone at 304 ng mL^{-1} , (B) ponasterone A at 438 ng mL^{-1} and ecdysone 340 ng mL^{-1} , (C) makisterone A at 210 ng mL^{-1} and (D) underivatized standards.

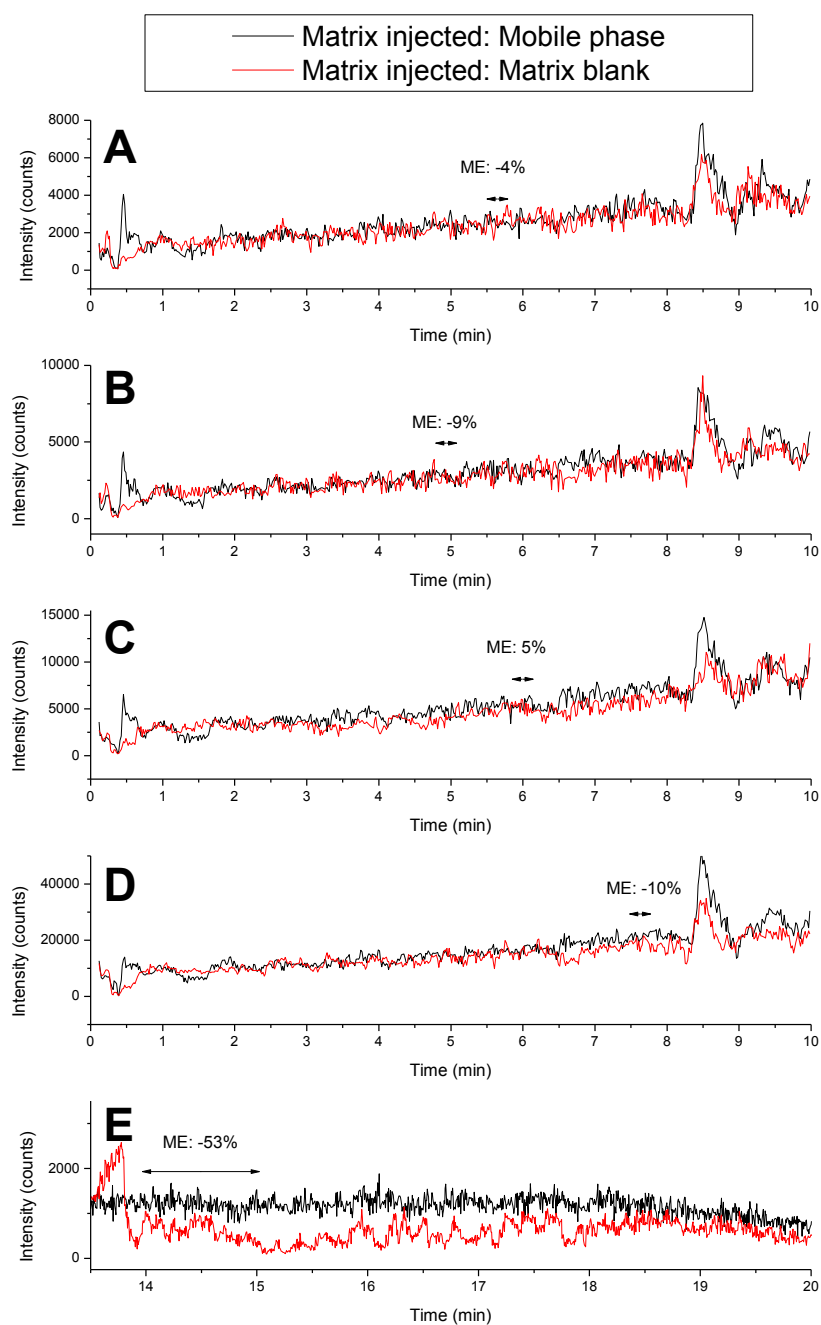


Figure 23 Matrix effects (ME) comparison by post column infusion technique of internal standard and analytes in mobile phase (black line) versus matrix blank (red line): (A) makisterone A, (B) 20-hydroxyecdysone, (C) ecdysone, (D) ponasterone A, (E) retinoic acids. Arrows indicate retention windows of analyte.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif général de ce projet de recherche était de développer une méthode capable d'évaluer le risque d'exposition à des concentrations environnementales de contaminants d'intérêt émergent et permettre de prioriser les contaminants à éliminer.

Les essais biologiques classiques utilisés pour l'évaluation du risque écotoxicologique sont insuffisamment sensibles pour répondre à cette problématique. Le développement d'un nouvel essai biologique métabolomique, utilisant une espèce aquatique dont le rôle écologique est essentiel à la survie de plusieurs autres espèces et cibler un ou plusieurs métabolismes clés à la survie de l'espèce ciblée, a été effectué

L'objectif du travail réalisé dans le cadre de ce projet de recherche était de développer une méthode analytique capable de quantifier les ecdystéroïdes et l'acide rétinoïque chez la puce d'eau. Cet objectif a pu être atteint par l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ce qui a permis d'augmenter la sélectivité de la quantification des ecdystéroïdes par rapport aux méthodes radioimmunologiques utilisées. En effet, l'utilisation de la spectrométrie de masse permet, à l'aide de la mesure de réactions sélectionnées (SRM), de faire la distinction entre le makisterone A (ISTD), le ponasterone A (ou l'ecdysone) et la 20-hydroxyecdysone. Davantage de sélectivité a été obtenue par la séparation chromatographique du ponasterone A et de l'ecdysone (deux isomères) ainsi que des isomères de l'acide rétinoïque par l'optimisation des phases mobiles utilisées ainsi que par l'optimisation de la phase stationnaire. L'optimisation de la phase mobile et des additifs de phase mobiles a permis de conclure qu'un gradient chromatographique utilisant (A) ACN : MeOH (2 : 3) + 0.1 % d'acide acétique et (B) H₂O 0.1 % d'acide acétique permettait d'obtenir la meilleure sensibilité. L'utilisation d'une colonne analytique à cœur solide a amélioré significativement l'efficacité de séparation des isomères de l'acide rétinoïque ce qui a permis l'identification d'au moins deux isomères et potentiellement 3 autres.

L'augmentation de la sensibilité obtenue par la modification spécifique de la structure, par dérivation à l'aide d'hydroxylamine à pH 2.7, des ecdystéroïdes et l'utilisation d'un analyseur quadripolaire ont permis de rivaliser avec la limite de quantification obtenue par une méthode radiommunologique. Les limites de quantification qui ont été obtenues vont de 210 à 380 pg mL⁻¹ pour trois ecdystéroïdes (20-hydroxyecdysone, ecdysone et ponasterone A) et de 5 ng mL⁻¹ pour la somme des isomères de l'acide rétinoïque. La méthode développée répond aux critères analytiques d'exactitude (<15%) et de précision (<15%) pour la 20-hydroxyecdysone et ecdysone. Bien que la précision soit bonne (<15%) pour la somme des acides rétinoïques et pour le ponasterone A, l'exactitude pour ces deux composés présente un biais négatif, -24.8 à -30.5 % et -36.3 à -41.7 % pour le ponasterone A et la somme des acides rétinoïques respectivement. Néanmoins, ce biais négatif est stable pour trois concentrations et est majoritairement expliqué par les effets de matrices.

Les performances de la méthode analytique ont été démontrées par l'analyse d'extraits de *D. magna*. La 20-hydroxyecdysone a pu être quantifiée chez les adultes (19 ± 8 pg ind⁻¹) et les juvéniles (3.6 ± 1.0 pg ind⁻¹), mais seulement détectée chez les néonates (≈ 0.19 pg ind⁻¹). De plus, des niveaux d'ecdysone ont pu être détectés chez la daphnie adulte (≈ 1.8 pg ind⁻¹). La méthode peut être utilisée pour évaluer un risque biologique d'exposition à des contaminants d'intérêt émergents et cela même si une perturbation des niveaux d'ecdystéroïdes chez la puce ne constitue pas encore une preuve suffisante pour démontrer une toxicité hors de tout doute, cette perturbation permet de démontrer la présence d'un risque d'exposition potentiel.

Bien que la méthode de quantification développée ne soit validée que pour un organisme (*D. magna*), la similitude dans la composition chimique et le métabolisme d'autres espèces de crustacés et d'insectes permettrait probablement un transfert méthodologique avec seulement une validation partielle. Ceci pourrait permettre notamment l'obtention de fonds pour la recherche sur des espèces d'intérêt commercial comme le crabe, le homard ou la crevette et d'autres espèces proliférant en eau salée telles que *Americamysis bahia* ainsi que les différentes espèces de krill. Ainsi, la méthode pourrait se ramifier et être utilisée pour entreprendre des projets de recherche comme l'évaluation du risque écotoxicologique d'exposition à des composés émergents dans une eau saline sur *Americamysis bahia* ou *Euphausia superba*.

Enfin, la méthode développée est un excellent outil qui pourra permettre une étude plus approfondie du métabolisme de la puce d'eau et valider les hypothèses suivantes :

Hypothèse 1 : La voie de synthèse principalement utilisée chez la puce d'eau 2,22 dideoxyecdysone > 2 deoxyecdysone > ecdysone > 20-hydroxyecdysone. Les voies de synthèse impliquant le ponasterone A seraient inactives.

Hypothèse 2 : L'acide rétinoïque n'est pas une molécule synthétisée par la puce d'eau.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] United States Environmental Protection Agency (US-EPA), (2010), *Treating contaminants of emerging concern: a literature review database* [en ligne] Disponible: <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/ppcp/results.cfm> [Consulté] 29Jun. 2015.
- [2] United States Environmental Protection Agency (US-EPA), (2000), *Ecotox database* [en ligne] Disponible: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/> [Consulté] 27Nov. 2015.
- [3] United States Environmental Protection Agency (US-EPA), (2002), *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition October 2002* [en ligne] Disponible: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007_07_10_methods_wet_disk2_at_x.pdf [Consulté] 27Nov. 2015.
- [4] K. Kidd, P. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, R.W. Flick, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 8897–8901.
- [5] H.J. De Lange, W. Noordoven, A.J. Murk, M. Lüring, E.T.H.M. Peeters, *Aquat. Toxicol.* 78 (2006) 209–216.
- [6] D. Martin-Creuzburg, *Gen. Comp. Endocrinol.* 151 (2007) 66–71.
- [7] W.S. Baldwin, R. Bailey, K.E. Long, S. Klaine, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 1564–9.
- [8] R. Lafont, *Ecotoxicology* 9 (2000) 41–67.
- [9] G. LeBlanc, *Ecotoxicology* (2007) 61–81.
- [10] X. Mu, G. Leblanc, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 1085–1091.
- [11] I. Dodson, M. Brewer, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 7–11.
- [12] D. Ebert, *Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in Daphnia*, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005.
- [13] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), (2004), *OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 202, Daphnia sp. Acute Immobilisation Test* [en ligne] Disponible: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en [Consulté] 27Nov. 2015.
- [14] D. Mykles, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127 (2011) 196–203.
- [15] E. Sumiya, Y. Ogino, H. Miyakawa, C. Hiruta, K. Toyota, S. Miyagawa, T. Iguchi, *Front. Zool.* 11 (2014) 60.
- [16] K.F. Rewitz, L.I. Gilbert, *BMC Evol. Biol.* 8 (2008) 60.
- [17] F. Lachaise, A. Le Roux, *J. Crustac. Biol.* 13 (1993) 198–234.
- [18] D. Böcking, C. Dauphin-Villemant, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23 (1993) 57–63.

- [19] W. Wang, E. Spaziani, J. Exp. Zool. 735 (2000) 725–735.
- [20] Y.H. Wang, G. Wang, G. a LeBlanc, Gen. Comp. Endocrinol. 150 (2007) 309–18.
- [21] A.W. Olmstead, G. a Leblanc, J. Exp. Zool. 293 (2002) 736–9.
- [22] X. Mu, G. a Leblanc, J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol. 301 (2004) 793–801.
- [23] L.M. Riddiford, Gen. Comp. Endocrinol. 179 (2012) 477–84.
- [24] R. Blomhoff, J. Neurobiol. 66 (2006) 606–630.
- [25] C. Horvath, S.R. Lipsky, J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 109–116.
- [26] Waters Corp, (2015), *CORTECS 1.6 μ m Columns Brochure* [en ligne] Disponible: https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004675en_1.6.pdf [Consulté] 28Nov. 2015.
- [27] G. Guiochon, F. Gritti, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1915–38.
- [28] L. Konermann, E. Ahadi, Anal. Chem. (2012) 2–9.

ANNEXE I

Procédure d'opération normalisée

CHERCHEUR PRINCIPAL:

Pedro Alejandro Segura, Ph.D.

Université de Sherbrooke, Environmental and Analytical Chemistry Laboratory

3 novembre 2015

MÉTHODE D'ANALYSE DES ECDYSTÉROÏDES ET RÉTINOÏDES CHEZ DAPHNIA MAGNA

REDIGE PAR PHILIPPE VENNE	APPROUVE PAR PEDRO A. SEGURA
DATE : 3 NOVEMBRE 2015	DATE :

3 novembre 2015

Page 1/21

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

20E	20-hydroxyecdysone
9cis	Acide 9-cis rétinoïque
AA	Acide acétique
ACN	Acétonitrile
Alltrans	Acide tout-trans rétinoïque
<i>D.magna</i>	<i>Daphnia magna</i> Straus (puce d'eau)
E	Ecdysone
FA	Acide formique
H ₂ O	Eau
LC/MS/MS	Chromatographie liquide / Spectrométrie de masse en tandem
MakA	Makisterone A
MeOH	Méthanol
MF	Méthylfarnesoate
MTBE	Méthyl <i>tert</i> -butyl éther
PonA	Ponasterone A
QC	Contrôle de qualité

DESCRIPTION

Cette procédure décrit comment extraire et quantifier les ecdystéroïdes et rétinoïdes chez *D. magna*. Elle décrit également comment un élevage fonctionnel de *D.magna* peut être maintenu.

MATÉRIEL

- Bouchons de vials (#C779200XBBM, Chromatographic Specialties)
- Compte-goutte
- Falcon™ 50mL Conical Centrifuge Tubes (14-432-22, Fisher Scientific)
- Insert en verre, Restek 350ul Flat Bottom (RK24517, Chromatographic Specialties)
- Kimax Culture tubes, Disposable with Screw Cap, 16x100 mm (89003-570, Fisher Scientific)
- Kimble-Chase Amber Screw Thread Vial (18,5 mL) (14-957-253, Fisher Scientific)
- Pipettes pasteur de verre (#170-CTB700-3, Ultident)
- Poire de pipette Pasteur
- Thermo Scientific™ Pierce™ Tissue Strainers, 250 µm (PI87791, Fisher Scientific)
- Tubes de culture borosilicate 13x100 mm (#14-961-27, Fisher)
- Vial d'injection pour GC et LC (#C779100W, Chromatographic Specialties)

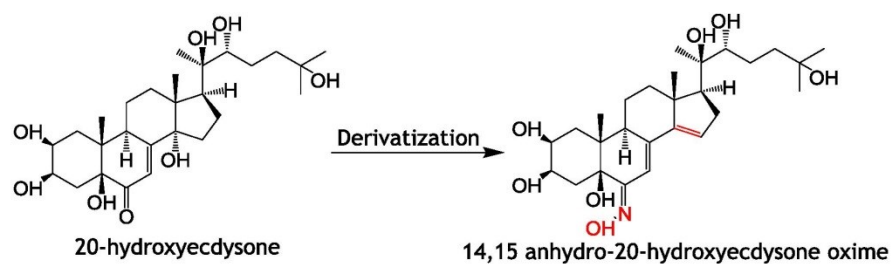
RÉACTIFS

- 20-hydroxyecdysone (sc-202407, Santa Cruz Biotech)
- Acétonitrile Optima (A955-4, FisherScientific)
- Acide 9-cis rétinoïque (sc-205589, Santa Cruz Biotech)
- Acide tout-trans rétinoïques (sc-200898, Santa Cruz Biotech)
- Acitretin (S1368-25MG, Cedarlane)
- Eau LC/MS Optima (W6-4, Fisher Scientific)
- Ecdysone (sc-202595, Santa Cruz Biotech)
- Daphnia Bio-pure congelés, Hikari
- Makisterone A (sc-202218A, Santa Cruz Biotech)
- Méthanol Optima (A456-4, FisherScientific)
- Methyl tert-butyl ether HPLC (E127-4, Fisher Scientific)
- Ponasterone A (sc-202768, Santa Cruz Biotech)

MÉTHODES

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode libère les ecdystéroïdes et rétinoïdes contenus dans la puce d'eau (*D. magna*) par sonication. Le contenu de l'organisme solubilisé dans le méthanol 1% FA est ensuite oximé à l'aide d'une solution acide d'hydroxylamine hydrochloride pour obtenir la forme oxime des ecdystéroïdes présentant une fonction cétone en position 6.



Oximation des ecdystéroïdes par l'hydroxylamine hydrochloride

COLLECTION DES ÉCHANTILLONS

L'échantillon se compose d'entre 25 (adultes) et 100 (juvéniles et néonates) individus collectés à l'aide d'un compte-goutte, filtrés et lavés à l'aide d'un filtre à tissu dont la maille est de 250 μm .



Pierce™ Tissue Strainers, 250 μm , 2.5 mL

PRÉPARATION DES SOLUTIONS

1. Préparation des solutions standards

a. Solution-mère de 20-hydroxyecdysone à 0.1 mg/mL

- Peser environ précisément 1.0 mg d'ecdysone et dissoudre dans 10 mL de MeOH.
- Bien agiter et vérifier que la dissolution est complète.
- Entreposer à -20°C

b. Solution-mère d'ecdysone à 100 $\mu\text{g/mL}$

- Même procédure qu'en a.

c. Solution-mère de ponasterone A à 100 $\mu\text{g/mL}$

- Même procédure qu'en a

d. Solution-mère de makisterone A à 100 $\mu\text{g/mL}$

- Même procédure qu'en a

e. Solution-mère d'acide 9-cis rétinoïque à 100 $\mu\text{g/mL}$

- Même procédure qu'en a

f. Solution-mère d'acide tout-trans rétinoïque à 100 $\mu\text{g/mL}$

- Même procédure qu'en a

g. Solution-mère d'acitretin à 100 $\mu\text{g/mL}$

- Même procédure qu'en a

2. Préparation des solutions standards intermédiaires

a. Solution intermédiaire d'ecdystéroïdes à 1 µg/mL

- i. Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 100 µL de solution-mère à 100 µg/mL des ecdystéroïdes.
- ii. Compléter avec du MeOH.
- iii. Entreposer à -20°C

b. Solution intermédiaire de rétinoïdes à 1 µg/mL

- i. Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 100 µL de solution-mère à 100 µg/mL des ecdystéroïdes.
- ii. Compléter avec du MeOH.
- iii. Entreposer à -20°C

c. Solution intermédiaire combinée d'ecdystéroïdes et rétinoïdes à 10 ng/mL (20E, E, PonA), 100 ng/mL (9cis, Alltrans).

- i. Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 100 µL de la solution d'ecdystéroïdes à 1 µg/mL, ajouter 1 mL de la solution intermédiaire de rétinoïdes.
- ii. Compléter avec du MeOH.
- iii. Entreposer à -20°C

d. Solution des standards internes makisterone A et acitretin.

- i. Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 100 µL de la solution d'acitretin à 100 µg/mL, ajouter 5 mL de la solution de makisterone purifiée (voir procédure dans l'information supplémentaire de l'article : *Quantification of ecdysteroids and retinoic acids in whole daphnids by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*
- ii. Compléter avec du MeOH.
- iii. Diluer encore d'un facteur 1/10 dans le MeOH.
- iv. Entreposer à -20°C

3. Préparation des solutions de travail

a. Préparation des solutions de travail pour la courbe de calibration

- i. Effectuer les dilutions du tableau ci-dessous en utilisant une solution combinée d'ecdystéroïdes et rétinoïdes à 10 ng/mL (20E, E, PonA), 100 ng/mL (9cis et Alltrans).

Calibration level	Volume de la solution combinée d'ecdystéroïdes et rétinoïdes (µL)	Ecdysteroids (pg/mL)			Retinoids (ng/mL)	
		20E	E	Pon A	9cis	Alltrans
0	-	-	-	-	-	-
1	300	285	318	411	4.35	3.33
2	500	475	530	685	7.25	5.55
3	750	712.5	795	1027.5	10.88	8.33
4	1000	950	1060	1370	14.50	11.10
5	1200	1140	1272	1644	17.40	13.32
6	1500	1425	1590	2055	21.8	16.65

ii. Compléter à 10 mL avec du MeOH 1% FA.

iii. Entreposer à -20°C

b. Préparation des solutions les contrôles de qualité (QC)

- i. Effectuer les dilutions du tableau ci-dessous en utilisant une solution combinée d'ecdystéroïdes et rétinoïdes à 10 ng/mL (20E, E, PonA), 100 ng/mL (9cis et Alltrans).

QC	Volume de la solution combinée d'ecdystéroïdes et rétinoïdes (µL)	Ecdysteroids (pg/mL)			Retinoids (ng/mL)	
		20E	E	Pon A	9cis	Alltrans
LOW	300	285	318	411	4.35	3.33
MED	500	475	530	685	7.25	5.55
HIGH	750	712.5	795	1027.5	10.88	8.33

- i. Compléter à 10 mL avec un extrait de Daphnia Hiraki congelés à 50 mg (masse humide)/mL dans le MeOH 1% FA.

ii. Entreposer à -20°C

4. Préparation des solutions pour l'extraction

a. Solution MeOH 1% FA

- i. Dans une bouteille en verre, ajouter 500 mL de MeOH.
ii. Retirer 1 mL de MeOH et ajouter 1 mL d'acide acétique glacial.

b. Solution d'hydroxylamine hydrochloride 100 mg/mL

- i. Peser environ 1g d'hydroxylamine hydrochloride et dissoudre dans 10 mL d'eau Optima.
ii. Utiliser la journée même.

5. Préparation des solutions pour la chromatographie

- a. **Phase mobile B1 – MeOH/ACN (3:2) + 0.1% AA.**
 - i. Dans une bouteille en verre, ajouter 600 mL de MeOH.
 - ii. Ajouter 400 mL d'ACN.
 - iii. Ajouter 1 mL d'acide acétique glacial.
- b. **Phase mobile A1 – 0.1 % AA dans l'eau**
 - i. Dans une bouteille en verre, ajouter 1000 mL d'eau.
 - ii. Ajouter 1 mL d'acide acétique glacial.
- c. **Solution Weak Wash – 0.1 % AA dans l'eau**
 - i. Idem Phase mobile B1 – 0.1 % AA dans l'eau.
 - ii. Une solution de 0.1% FA dans l'eau peut aussi être utilisée
- d. **Solution Strong Wash – Méthanol**
 - i. Dans une bouteille en verre, ajouter 1000 ml de méthanol
 - ii. Une solution de MeOH 0.1% FA peut également être utilisée

PRÉPARATIONS DES ÉCHANTILLONS

1. Préparation préliminaire

Les échantillons de Daphnia filtrés et lavés à l'aide d'un filtre à tissu dont la maille est de 250 µm sont déposés dans un Flacon 50 mL ou un vial en verre contenant 1 mL de MeOH 1% FA et soniqués pendant 15 minutes.

2. Procédure d'extraction d'ecdystéroïdes et rétinoides chez *D. magna*.

- a. Une aliquote de 800 µL de l'extrait soniqué (ou point de calibration) est utilisé pour l'extraction et 50 µL de la solution de standards internes et déposé dans un tube en verre vissable.
- b. L'aliquote est évaporée sous azote, puis 1 mL d'une solution d'hydroxylamine hydrochloride 100 mg/mL est ajouté et l'échantillon placé à 70°C pour 1h30 minutes.
- c. Une extraction liquide-liquide est réalisée sur l'échantillon à l'aide de 2 X 1.5 mL MTBE.
- d. L'échantillon est évaporé à sec sous azote et reconstitué dans 150 µL MeOH.

1. Système

- a. Les analyses sont effectuées sur un UPLC couplé à un spectromètre de masse en tandem de Waters Quattro Premier
- b. Colonne : CORTECS UPLC® C18+ 1.6 µm 2.1 X 50 mm

2. Préparation de l'analyse par LC

- a. Mettre en place les solutions pour la chromatographie comme suit :
 - i. Ligne A1 : H₂O + 0.1% AA
 - ii. Ligne B1 : MeOH/ACN (3:2) + 0.1% AA.
 - iii. Strong Wash : MeOH
 - iv. Weak Wash : H₂O + 0.1% AA
- b. La méthode LC est : E_T_12_PL (Annexe A)
- c. La méthode MS est : ESI+-SWITCH_NEG_ajusted(Annexe B)
- d. La tune page est : Tune_MSMS (Annexe C)
- e. Le temps d'analyse est de 30 minutes
- f. Volume d'injection 10 µL.
- g. Monter la « sample list » de la façon suivante :
 - i. Standard system suitability (5-8X)
 - ii. Un blanc de diluant
 - iii. Les points de courbe de P0 à P6
 - iv. Un blanc de diluant
 - v. Les échantillons de contrôle (QC_{LOW}, QC_{MED}, QC_{HIGH})
 - vi. Un blanc de diluant
 - vii. Les échantillons en intercalant un blanc et un QC à toutes les dix injections

3. Traitement des échantillons et des résultats

L'acquisition est effectuée avec le logiciel MassLynx®. Les intégrations et le traitement des résultats sont effectués avec la fonctionnalité QuanLynx® de MassLynx. Un minimum de 4 standards sur 6 devraient avoir une déviation à l'intérieur de ±15% pour la précision. Les autres données (exemple : manipulations, résultats d'analyse de l'acquisition, etc.) sont compilées dans les cahiers de laboratoire.

- a. La méthode de traitement des acquisitions pour QuanLynx est : (Annexe D)

ANNEXE A MÉTHODE UPLC

Inlet Method Report MassLynx 4.1 SCN805

Page 1 of

Method File: C:\MassLynx\Philippe Venne.PRO\Acqddb\E_T_12_PL
Last Modified: Tuesday, May 19, 2015 13:51:58 Eastern Daylight Time
Printed: Tuesday, November 03, 2015 13:05:09 Eastern Standard Time

Waters Acquity SDS Method

Run Time: 30.00 min
Comment: methode generale
Solvent Selection A: A1
Solvent Selection B: B1
Low Pressure Limit: 200 psi
High Pressure Limit: 12000 psi
Solvent Name A: Water
Solvent Name B: Acetonitrile
Switch 1: No Change
Switch 2: No Change
Switch 3: No Change
Seal Wash: 5.0 min
Chart Out 1: System Pressure
Chart Out 2: %B
System Pressure Data Channel: No
Flow Rate Data Channel: No
%A Data Channel: No
%B Data Channel: No
Primary A Pressure Data Channel: No
Accumulator A Pressure Data Channel: No
Primary B Pressure Data Channel: No
Accumulator B Pressure Data Channel: No
Degasser Pressure Data Channel: No
[Gradient Table]
Time(min) Flow Rate %A %B Curve
1. Initial 0.500 95.0 5.0
2. 7.89 0.500 45.0 55.0 6
3. 8.00 0.500 35.0 65.0 6
4. 13.00 0.500 28.0 72.0 6
5. 20.00 0.500 0.0 100.0 6
6. 20.01 0.500 0.0 100.0 1
7. 22.00 0.500 0.0 100.0 1
8. 22.01 0.500 95.0 5.0 1
Run Events: Yes

Waters Acquity Autosampler Method

Run Time: 30.00 min
Comment:
Load Ahead: Disabled
Loop Option: Partial Loop
LoopOffline: Disable
Weak Wash Solvent Name: Water
Weak Wash Volume: 600 uL
Strong Wash Solvent Name: Methanol
Strong Wash Volume: 200 uL
Target Column Temperature: 30.0 C
Column Temperature Alarm Band: 5.0 C
Target Sample Temperature: 20.0 C
Sample Temperature Alarm Band: Disabled
Full Loop Overfill Factor: Automatic
Syringe Draw Rate: Automatic
Needle Placement: Automatic
Pre-Aspirate Air Gap: Automatic
Post-Aspirate Air Gap: Automatic
Column Temperature Data Channel: No
Ambient Temperature Data Channel: No
Sample Temperature Data Channel: No
Sample Organizer Temperature Data Channel: No
Sample Pressure Data Channel: No
Switch 1: No Change
Switch 2: No Change
Switch 3: No Change
Switch 4: No Change
Chart Out: Sample Pressure
Sample Temp Alarm: Disabled
Column Temp Alarm: Enabled
Run Events: Yes
Needle Overfill Flush: Automatic

Inlet Method Report MassLynx 4.1 SCN805 Page 2 of

Method File: C:\MassLynx\Philippe Venne.PRO\Acqddb\E_T_12_PL
Last Modified: Tuesday, May 19, 2015 13:51:58 Eastern Daylight Time
Printed: Tuesday, November 03, 2015 13:05:09 Eastern Standard Time

Sample Loop Size: 20.0
End Of Report

ANNEXE B MÉTHODE MS

MS Method Report - MassLynx 4.1 SCN805

Page 1 of 1

File: c:\masslynx\philippe.venne.pro\acqddb\esi+-switch_neg_ajusted.exp
 Printed: Tuesday, November 03, 2015 13:04:00 Eastern Standard Time

Creation Time Thu 17 Sep 2015 19:19:09
 Instrument Identifier
 Version Number 1.0
 Duration (min) 30.0
 Calibration Filename C:\MassLynx\Rene.PRO\ACQUDB\20150417_calibration_Naformate.cal
 Solvent Delay Divert Valve Enabled 0
 Number Of Functions 2

Function 1 : MRM of 4 mass pairs, PIC , Time 0.00 to 10.00, ES+

Type MRM
 Ion Mode ES+
 Inter Channel Delay (sec) 0.020
 InterScan Time (sec) 0.100
 Span (Da) 0.0
 Start Time (min) 0.0
 End Time (min) 10.0

Ch	Prnt (Da)	Dau (Da)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Delay (s)	Compound
1	462.39	315.87	0.200	Tune	30.00	0.020	Ponasterone A
2	462.39	443.95	0.200	Tune	20.00	0.020	Ecdysone
3	478.38	315.87	0.200	Tune	30.00	0.020	20-Hydroxyecdysone
4	492.35	315.87	0.200	Tune	30.00	0.100	Makisterone A

Function 2 : MRM of 2 mass pairs, PIC , Time 10.00 to 30.00, ES-

Type MRM
 Ion Mode ES-
 Inter Channel Delay (sec) 0.020
 InterScan Time (sec) 0.100
 Span (Da) 0.0
 Start Time (min) 10.0
 End Time (min) 30.0

Ch	Prnt (Da)	Dau (Da)	Dwell (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Delay (s)	Compound
1	299.27	254.87	0.200	Tune	15.00	0.020	Retinoic acids
2	325.24	265.85	0.200	Tune	15.00	0.100	Acitretin

ANNEXE C TUNE FILE

Quattro Premier Tune Parameters - MassLynx 4.1 SCN805

Page 1 of 2

File: C:\MassLynx\Philippe Venne.PRO\ACQUDB\Tune_MSMS.ipr

Instrument: QUATTROPREMIER

Printed: Tuesday, November 03, 2015 13:06:04 Eastern Standard Time



Type	Start Mass	End Mass	Set Mass
MS Scan	100.00	500.00	
Source (ES+)	Settings	Readbacks	
Capillary (kV)	2.50	0.02	
Cone (V)	50	-1	
Extractor (V)	5	-1	
RF Lens (V)	0.0		
Source Temperature (°C)	120	120	
Desolvation Temperature (°C)	450	29	
Cone Gas Flow (L/Hr)	50	1	
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	700	2	
Instrument Name			
Analyser	Settings	Readbacks	
LM 1 Resolution	14.5		
HM 1 Resolution	14.5		
Ion Energy 1	0.5		
Entrance	0	-1	
Collision	30	-1	
Exit	1.0	-0.6	
LM 2 Resolution	14.0		
HM 2 Resolution	14.0		
Ion Energy 2	1.0		
Multiplier (V)	650	-1	
Syringe Pump Flow (uL/min)	10		
Collision Cell Pressure			
Pressure (m bar)	< 1e-4		
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.40	0.18	
T-WAVE Parameters			
Source T-WAVE Parameters			
Automated			
Collision Cell T-WAVE Parameters			

3 novembre 2015

Page 12/21

Quattro Premier Tune Parameters - MassLynx 4.1 SCN805

Page 1 of 2

File: C:\MassLynx\Philippe Venne.PRO\ACQUDB\Tune_MSMS.ipr

Instrument: QUATTROPREMIER

Printed: Tuesday, November 03, 2015 13:06:20 Eastern Standard Time



Type	Start Mass	End Mass	Set Mass
MS Scan	100.00	500.00	
Source (ES-)	Settings	Readbacks	
Capillary (kV)	3.00	0.02	
Cone (V)	35	-1	
Extractor (V)	5	-1	
RF Lens (V)	0.0		
Source Temperature (°C)	120	119	
Desolvation Temperature (°C)	450	29	
Cone Gas Flow (L/Hr)	50	1	
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	700	2	
Instrument Name			
Analyser	Settings	Readbacks	
LM 1 Resolution	14.5		
HM 1 Resolution	14.5		
Ion Energy 1	0.5		
Entrance	0	-1	
Collision	5	-1	
Exit	1.0	-0.9	
LM 2 Resolution	14.0		
HM 2 Resolution	14.0		
Ion Energy 2	1.0		
Multiplier (V)	650	-1	
Syringe Pump Flow (uL/min)	20		
Collision Cell Pressure			
Pressure (m bar)	< 1e-4		
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.40	0.18	
T-WAVE Parameters			
Source T-WAVE Parameters			
Automated			
Collision Cell T-WAVE Parameters			

ANNEXE D QUANLYNX PROCESS METHOD

Application: QuanLynx Method Editor 4.1 SCN805
Method Report: E:\Philippe_Venne.PRO\MethDB\ESI+AA_Validation_ajust.mdb
Printed: Monday, November 02, 2015 17:20:12 Est

	Compound Name	CAS Number	Compound Type	Quantification Trace	Include Quan Trace in Response?
1	20-Hydroxyecdysone (oxi...			478.38>315.87	YES
2	Ecdysone (oxime-H2O)			462.39>443.95	YES
3	Ponasterone A (oxime-H2O)			462.39>315.87	YES
4	Retinoic acids			299.27>254.87	YES
5	Makisterone A (oxime-H2O)			492.35>315.87	YES
6	Acitretin			325.24>265.85	YES

	Acquisition Func Number	Conc of Std: Levels	Conc of Std: Conc	Use Stock Conc Factor	Stock Conc Factor
1	1	Conc A	1.0000	NO	1.0000
2	1	Conc B	1.0000	NO	1.0000
3	1	Conc C	1.0000	NO	1.0000
4	2	Conc D	1.0000	NO	1.0000
5	1	Fixed	1.0000	NO	1.0000
6	2	Fixed	1.0000	NO	1.0000

	Use absolute mass win...	Chro Mass Window (Da)	Chro Mass Window (ppm)	Locate Peak Using	Propagate RT?
1	YES	1.0000	10.0000	Retention Time	NO
2	YES	1.0000	10.0000	Retention Time	NO
3	YES	1.0000	10.0000	Retention Time	NO
4	YES	1.0000	10.0000	Retention Time	NO
5	YES	1.0000	10.0000	Retention Time	NO
6	YES	1.0000	10.0000	Retention Time	NO

	Predicted RT (mins)	Predicted RRT	RRT Reference	RT Window (mins) ±	RT Upper Tol (%)	RT Lower Tol (%)
1	4.8300	0.0000	None	0.2000	0.00	0.00
2	5.8200	0.0000	None	0.2000	0.00	0.00
3	7.5700	1.0000	None	0.2000	0.00	0.00
4	14.3700	1.0000	None	0.2000	0.00	0.00
5	5.5900	1.0000	None	0.2000	0.00	0.00
6	11.7500	1.0000	None	0.2000	0.00	0.00

	Flag RT Tolerance?	Locate Peak Selection	Update Meth. Times Using Multi-Sample...	Int Std: 1
1	NO	Nearest	NO	5: Makisterone A (oxime-H...
2	NO	Nearest	NO	5: Makisterone A (oxime-H...
3	NO	Nearest	NO	5: Makisterone A (oxime-H...
4	NO	Nearest	NO	6: Acitretin
5	NO	Nearest	NO	None
6	NO	Nearest	NO	None

	Int Std: 2	Int Std: 3	Int Std: 4	Int Std: 5	Int Std: 6
1	None	None	None	None	None
2	None	None	None	None	None
3	None	None	None	None	None
4	None	None	None	None	None
5	None	None	None	None	None
6	None	None	None	None	None

Application: QuanLynx Method Editor 4.1 SCN805
Method Report: E:\Philippe_Venne.PRO\MethDB\ESI+AA_Validation_ajust.mdb
Printed: Monday, November 02, 2015 17:20:12 Est

	Int Std: 6	Totals Group	Totals Include	Calibration Ref Compound	Response Type
1	None		All	1: 20-Hydroxyecdysone (oxime-...	Internal (relative - ...
2	None		All	2: Ecdysone (oxime-H2O)	Internal (relative - ...
3	None		All	3: Ponasterone A (oxime-H2O)	Internal (relative - ...
4	None		All	4: Retinoic acids	Internal (relative - ...
5	None		All	5: Makisterone A (oxime-H2O)	External (absolute ...
6	None		All	6: Acitretin	External (absolute ...

	Response Uses	Polynomial Type	Calibration Origin	Weighting Function	Axis Transformation	Concentration Units	User RF Mode
1	Area	Linear	Exclude	None	None	ng/mL	NO
2	Area	Linear	Exclude	None	None	ng/mL	NO
3	Area	Linear	Exclude	None	None	ng/mL	NO
4	Area	Linear	Exclude	None	None	ng/mL	NO
5	Area	Linear	Exclude	None	None	ng/mL	NO
6	Area	Linear	Exclude	None	None	ng/mL	NO

	User RF Value	Ignore Zero Stds?	Ignore Zero QCs?	Propagate Cal?	Smooth Enabled?	Smooth Method	Smooth Iterations
1	0.0000	NO	NO	YES	YES	Mean	2
2	0.0000	NO	NO	YES	YES	Mean	2
3	0.0000	NO	NO	YES	YES	Mean	2
4	0.0000	NO	NO	YES	YES	Mean	2
5	0.0000	NO	NO	YES	YES	Mean	2
6	0.0000	NO	NO	YES	YES	Mean	2

	Smooth Width	Apex Track Enabled?	Apex params from Ref Peaks?	PK to PK Baseline Noise	Auto PK to PK Baseline Noise?
1	2	YES	NO	10.0000	YES
2	2	YES	NO	10.0000	YES
3	2	YES	NO	10.0000	YES
4	2	YES	NO	10.0000	YES
5	2	YES	NO	10.0000	YES
6	2	YES	NO	10.0000	YES

	Peak Width at 5% Height (mins)	Auto Selection of Peak Width?	Baseline Start Thresh %	Baseline End Thresh %
1	30.0000	YES	0.00	0.50
2	30.0000	YES	0.00	0.50
3	30.0000	YES	0.00	0.50
4	30.0000	YES	0.00	0.50
5	30.0000	YES	0.00	0.50
6	30.0000	YES	0.00	0.50

	Detect Apex Track Shldr Peaks?	PK to PK Noise Amplitude	Auto Noise Measurement?	Balance	Splitting
1	NO	5440	NO	30.00	90.00
2	NO	5440	NO	30.00	90.00
3	NO	5440	NO	30.00	90.00
4	NO	5440	NO	30.00	90.00
5	NO	5440	NO	30.00	90.00
6	NO	5440	NO	30.00	90.00

Application: QuanLynx Method Editor 4.1 SCN805
Method Report: E:\Philippe_Venne.PRO\MethDB\ESI+AA_Validation_ajust.mdb
Printed: Monday, November 02, 2015 17:20:12 Est

	Splitting	Detect Standard Shldr Peaks?	Detect Shldr Peaks Thresh%	Reduce Tail	Reduce Height
1	90.00	NO	30.00	50.00	10.00
2	90.00	NO	30.00	50.00	10.00
3	90.00	NO	30.00	50.00	10.00
4	90.00	NO	30.00	50.00	10.00
5	90.00	NO	30.00	50.00	10.00
6	90.00	NO	30.00	50.00	10.00

	Resp Thresh Use Relative Height?	Resp Thresh Relative Height	Resp Thresh Use Absolute Height?	Resp Thresh Absolute Height
1	YES	1.50	NO	0
2	YES	1.50	NO	0
3	YES	1.50	NO	0
4	YES	1.50	NO	0
5	YES	1.50	NO	0
6	YES	1.50	NO	0

	Resp Thresh Use Relative Area?	Resp Thresh Relative Area	Resp Thresh Use Absolute Area?	Resp Thresh Absolute Area
1	YES	2.00	YES	5
2	YES	2.00	YES	5
3	YES	2.00	YES	5
4	YES	2.00	YES	5
5	YES	2.00	YES	5
6	YES	2.00	YES	5

	Integration Window Extent	Propagate Integration Params?	Secondary Ion RT Window (mins)	Update Ion Ratios Using Multi-Samples?
1	0.00	NO	0.0000	NO
2	0.00	NO	0.0000	NO
3	0.00	NO	0.0000	NO
4	0.00	NO	0.0000	NO
5	2.00	NO	0.0000	NO
6	2.00	NO	0.0000	NO

	Secondary Ion Trace	Use Secondary in Response Calc?	Secondary Ion Ratio	Secondary Ion Ratio Tolerance
1		NO	0.0000	0
2		NO	0.0000	0
3		NO	0.0000	0
4		NO	0.0000	0
5		NO	0.0000	0
6		NO	0.0000	0

	Secondary Must Exist?	Secondary Must Pass Ratio?	Toxic Equivalence Factor: 1	Toxic Equivalence Factor: 2
1	NO	NO	0.000000	0.000000
2	NO	NO	0.000000	0.000000
3	NO	NO	0.000000	0.000000
4	NO	NO	0.000000	0.000000
5	NO	NO	0.000000	0.000000
6	NO	NO	0.000000	0.000000

Application: QuanLynx Method Editor 4.1 SCN805
Method Report: E:\Philippe_Venne.PRO\MethDB\ESI+AA_Validation_ajust.mdb
Printed: Monday, November 02, 2015 17:20:12 Est

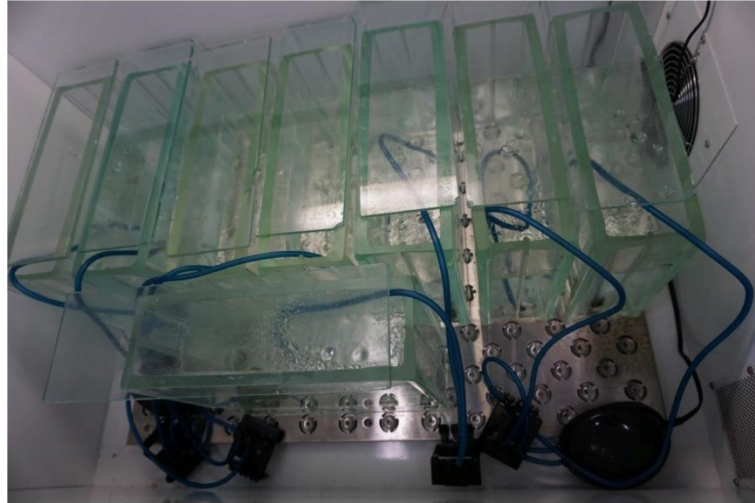
	Toxic Equivalence Factor: 1	Toxic Equivalence Factor: 2	Toxic Equivalence Factor: 3	Toxic Equivalence Factor: 4	Calculate Mole Ratio?
1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	NO
2	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	NO
3	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	NO
4	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	NO
5	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	NO
6	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	NO

	Unlabelled Ratio	Labelled Ratio	Signal-to-Noise method	Noise Calculation Factor	Noise Window Start (min)	Noise Window End (min)
1	0.0000	0.0000	RMS	3.00	0.0000	0.0000
2	0.0000	0.0000	RMS	3.00	0.0000	0.0000
3	0.0000	0.0000	RMS	3.00	0.0000	0.0000
4	0.0000	0.0000	RMS	3.00	0.0000	0.0000
5	0.0000	0.0000	RMS	3.00	0.0000	0.0000
6	0.0000	0.0000	RMS	3.00	0.0000	0.0000

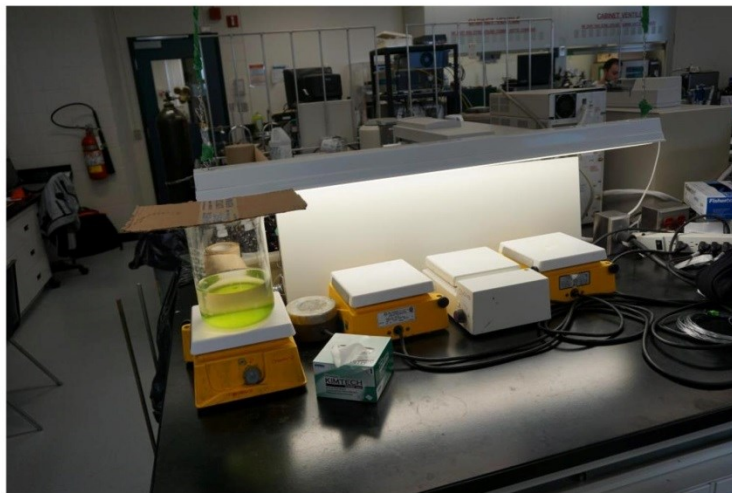
	Measure peak signal level from	Detection Limit Factor	Quant. Limit Factor	Propagate Detection Limit Settings?	Use EMPC?
1	Peak Baseline	3.0000	8.0000	NO	NO
2	Peak Baseline	3.0000	8.0000	NO	NO
3	Peak Baseline	3.0000	8.0000	NO	NO
4	Peak Baseline	3.0000	8.0000	NO	NO
5	Peak Baseline	3.0000	8.0000	NO	NO
6	Peak Baseline	3.0000	8.0000	NO	NO

ANNEXE E CULTURE DE DAPHNIA MAGNA

APERÇU DE L'ÉLEVAGE DE *DAPHNIA MAGNA*



APERÇU DE L'ÉLEVAGE D'ALGUE *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*



MATÉRIEL

- Agitateur magnétique (Fisherbrand)
- Aquariums
- Bac à vaisselle
- Bécher de 1L
- Fluorescent 18 pouces Cool White (Sylvania Premium)
- Fluorescent 48 pouces Cool White (Sylvania Premium)
- Jeux de tamis 180 µm, 300 µm, 560 µm, 900 µm (Hobby)
- Luminaire fluorescent d'atelier 48 pouces (Lithonia)
- Luminaire sous comptoir 18 pouces (Globe)
- Minuterie digitale programmable (50027, Woods)
- Pierre à air cylindriques (A962, Marina)
- Pipette sérologique jetable de 10 mL
- Plaque agitatrice
- Pompe à air (11116, Marina 200)
- Tube flexible d'un diamètre interne supérieur à 10 mm
- Tuyau à air Marina, 6 m (A1124, Marina)
- Vanne de réglage Ultra Marina à 3 sorties (A1179, Marina)

RÉACTIFS

- Bicarbonate de sodium (BP328-500, Fisher BioReagents)
- Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution 50X (B5282-500ML, Sigma-Aldrich)
- Chlorure de calcium dihydrate (BP510 500, Fisher BioReagents)
- Chlorure de potassium (BP366-500, Fisher BioReagents)
- Sulfate de magnésium heptahydrate (BP213 1, Fisher BioReagents)

CONDITIONS DE CULTURES

Culture de la puce d'eau (*D. magna*)

- a. Voir la section sur le sujet du mémoire de Philippe Venne

Culture de l'algue *Raphidocelis subcapitata*

- a. Voir la section sur le sujet du mémoire de Philippe Venne

PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE DES ALGUES, INOCULATION ET CONCENTRATION

- a. Un erlenmeyer contenant 500 mL d'eau MilliQ, un agitateur magnétique et recouvert d'un bouchon en mousse et de papier d'aluminium est autoclavé pendant 1h15.
- b. Introduire 10 mL de la solution concentrée du milieu Bold modifié 50X à l'aide d'une pipette stérile.
- c. Inoculer le milieu avec 1mL/100mL d'une solution concentrée d'algue.
- d. Remplacer le bouchon en mousse et le papier d'aluminium
- e. Placer l'erlenmeyer sur la plaque agitatrice sous le fluorescent Cool White.
- f. Après 10 à 14 jours retirer l'erlenmeyer et laisser décanter le milieu.
- g. Production du concentré d'algue : Après environ 1 semaine ou avant retirer le milieu de culture et conserver le dépôt d'algue dans environ 50 mL de milieu.



- h. Alimenter les daphnies avec 2 mL du concentré d'algues chaque jour.

NETTOYAGE DES AQUARIUMS DE DAPHNIA

- a. L'aquarium de daphnie est nettoyé 1 fois semaine
- b. Siphonner l'eau de l'aquarium (et daphnie) à l'aide du tuyau flexible de diamètre intérieur supérieur à 10 mm, diriger le liquide sur le montage de filtration préalablement rempli avec 1 litre d'eau.
- c. Effectuer le montage suivant pour éviter les débordements.

